

Interaktion von *Streptococcus pneumoniae* mit Faktoren der Blutgerinnung

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Hilger Jagau
aus Wolfenbüttel

1. Referentin: Privatdozentin Dr. Simone Bergmann
2. Referent: Prof. Dr. Michael Steinert
Eingereicht am 29.10.2018
Mündliche Prüfung (Disputation) am: 18.12.2018

Druckjahr 2019

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

In Begriff veröffentlicht zu werden *Jagau et al.*,

Tagungsbeiträge

Jagau, H., Rohde, M., Steinert M., and Bergmann, S.: *Streptococcus pneumoniae* triggers von Willebrand factor fiber formation, 3. German Pneumococcal and Streptococcal Symposium, Braunschweig 09/2016, Vortrag.

Jagau, H. and Bergmann, S.: Von Willebrand factor as endothelial foothold for *Streptococcus pneumoniae* in the blood flow, EuroPneumo 06/2017, Vortrag.

Jagau, H., Rohde, M., Lahme, Elspäß, V., Fulde, M., Brehm, M.A., Obser, T., Schneppenheim, Tegge, W., Kohler T., Hammerschmidt S., Köster R. W., Steinert M., and Bergmann, S.: Von Willebrand Factor Promotes Adhesion of *Streptococcus pneumoniae*, Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) Jahrestagung, Bochum 02/2018, Vortrag

Jagau, H., Rohde, M., Lahme, K., Behrens, I.-K., Elspäß, V., Lorz, G., Fulde, M., Kohler T., Hammerschmidt S., Brehm, M.A., Obser, T., König, G., Schneppenheim, R., Tegge, W., Steinert M., and Bergmann, S. Globular and fibrillar Von Willebrand Factor mediates adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to endothelial surface in blood flow, 48th Hämostase Symposium Hamburg, (eingeladener Vortrag von Simone Bergmann, Preisverleihung GLEA), November 2017

Jagau, H., ; Behrens, I. K.; Valentina E.; Lahme, K.; Lorz G.; Köster, R. W.; Schneppenheim, R.; Obser, T.; Brehm, M. A.; König, G.; Rohde, M.; Kohler, T.; Hammerschmidt, S.; Frank, R.; Tegge, W.; Fulde, M.; Steinert, M.; Bergmann, S.: VWF as new cofactor for adhesion of *S. pneumoniae*, projekt-symposium zur Interaktion von *Streptococcus Pneumonia* & von Willebrand Faktor, Braunschweig 04/2018, Vortrag.

Posterbeiträge

Jagau, H.; Rohde, M.; Behrens, I. K.; Fulde, M.; Steinert, M.; Bergmann, S.: *Streptococcus pneumoniae* binds Ultra Large Von Willebrand Factor. DGHM & VAAM: Microbiology and Infection 2017 Microbiome, Würzburg 03/2017, Poster

Jagau, H., Rohde, M., Lahme, K.; Behrens, I.-K., Fulde, M., Kohler T., Hammerschmidt S., Brehm, M.A., Obser, T., König, G., Schneppenheim, R., Steinert M., and Bergmann, S. Von Willebrand factor represents a new adhesion cofactor of *Streptococcus pneumoniae*. 1st International Congress of Respiratory Pathogens (ICORP) Rostock, November 2017, Poster

Jagau, H, Behrens, I. K.; Valentina E.; Lahme, K.; Lorz G.; Köster, R. W.; Schneppenheim, R.; Obser, T.; Brehm, M. A.; König, G.; Rohde, M.; Kohler, T.; Hammerschmidt, S.; Frank, R.; Tegge, W.; Fulde, M.; Steinert, M.; Bergmann, S.: Von Willebrand factor, a new adhesion-co factor of *Streptococcus pneumoniae*. Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) Jahrestagung, Wolfsburg 04/2018, Poster

Titelseite

Allein kann man viel schaffen, mit einem guten Team jedoch definiert man unschaffbar neu...

Irgendein verrückter der glaubt die Welt ein Stück weit verändern zu wollen, im Idealfall positiv.... 24.10.2018; 19:04

Danksagung

Bei PD Dr. **Simone Bergmann** möchte ich mich bedanken für das spannende und vielseitige Thema. Es hat mir immer Spaß gemacht sehr interdisziplinär zu arbeiten und das war mit der mir anvertrauten Thematik immer möglich. Vielen Dank für die schöne und herausfordernde Zeit. Danke für dein offenes Ohr, dein Engagement und die vielen Diskussionen. Du hast mein wissenschaftliches Denken mehr gefordert als jeder andere, dafür bin ich dir dankbar. Ebenso möchte ich mich bedanken für die Unterstützung bei der Nominierung für das Lindau Nobel Symposium mit unserem Projekt und die schnelle Korrektur.

Bei **Prof. Dr. Michael Steinert** möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und die Übernahme des 2ten Gutachtens bedanken. Danke auch für dein offenes Ohr und dafür das ich alles nutzen konnte, was ich gebraucht habe im Labor. Ebenso möchte ich mich bedanken für das ermöglichen der terminlich schnellen Verteidigung für meine berufliche, wissenschaftliche Zukunft.

Bei Prof. Dr. Michael Hust möchte ich mich bedanken für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und das du immer Zeit hattest, auch wenn ich kurzfristig eine Frage hatte. Und dafür das du auch meine schnelle Verteilung terminlich ermöglicht hast.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Reinhard W. Köster**. Danke dafür, dass Sie jederzeit mit Rat und Tat zur Verfügung standen. Ob es die Bereitstellung eines Stereomikroskop für die Injektion in Zebrafische mit Druckerzeuger war, den Sie sicherlich auch gut im Praktikum gebraucht hätten, die Unterstützung mit Ihrer Expertise und die Ermöglichung auch im Notfall auf ihr Konfokalmikroskop zurückzugreifen zu können. Danke dafür das Sie mich auch in meiner Nominierung für das Lindau Nobel Symposium unterstützt haben. Sie haben mir nicht nur den Zebrafisch als Model System nahegebracht, sondern sind für mich ein Vorbild für wissenschaftliche Zusammenarbeit in allen Ebenen.

Bei **Dr. Can M. Ünal** möchte ich mich für die Schöne Zeit im Labor, deine Hilfsbereitschaft und deine Warmherzigkeit bedanken. Immer wenn es ein Problem zu lösen gab, hast du mit Rat und Tat geholfen, egal wer es war, fast egal wann es war. Die schöne Zeit mit Dir und einen Großteil der AG Steinert in Istanbul hat sich in mein Hirn & Herz eingebrannt, wie die tollen

handgemachten Fladenbrote für den Döner, die auf so ominöse Weise den Abend verschwunden sind...Hannes und Jana wissen wovon ich spreche ;-). Danke für die schöne Zeit!

Bei **Dr. Janine Rasch** möchte ich mich für die schönen Stunden in Labor und abseits des Labors bedanken. Wenn wir in der AG Steinert eine Familie wären, du wärst die Mutter und Can (im übertragenen Sinne) der Vater ;-). Nicht nur, dass wir bei Dir oder bei Can immer zusammen gekocht haben und Du unser miteinander nicht nur gefördert hast, sondern auch gelebt hast, im Labor wie im Privaten.

Bei **Dr. Hannes Beims** möchte ich mich für die Aufnahme in die AG Steinert mit meiner Masterarbeit bedanken und dafür, dass du mich damals im Praktikum an der DSMZ mit der (flotten) Honigbiene bekannt gemacht hast. Dank Dir haben die Damen nicht nur mein Leben süßer gemacht (Autokorrektur ich zitiere: „Meine Leber Süßer gemacht“), sondern mir auch viel über Seuchenprävention im Tierbereich, erfolgreiche Zusammenarbeit und Konflikt-Management beigebracht.

Bei **Stefanie Thiem** möchte ich mich für die schöne Zeit im Labor, beim gemeinsamen kochen und feiern mit der AG Steinert bedanken. Wir waren alle zusammen schon ein einmaliges Team.

Bei meiner Bachelor-Studentin **Karen Lahme** möchte ich mich für die großartige Zusammenarbeit und ihr Engagement bedanken. Du hast dich nie beklagt, auch wenn es mal länger im Labor gedauert hat, bedingt durch zickige Pneumos. Wann immer man Deine Unterstützung benötigt hat, damit man parallel etwas anderes bearbeiten konnte, warst Du mit dabei. Danke für die Super-Teamarbeit.

Bei meinen Mastern Studentinnen **Valentina Elspaß**, **Kristina Schaab** (Alias: Tanja), **Ina-Kristin-Behrens** und **Georgina Lorz** möchte ich mich ebenso für die gute Team-Arbeit bedanken und die Unterstützung bei den vielseitigen Teilprojekten.

Ebenso danke ich der ganzen **AG Steinert** Bedanken für die spannende Zeit beim Zusammensitzen und über Problemen im Labor sprechen und die Kaffeepausen als kreative Ablenkung.

Bei **Dr. Junkai Li** möchte ich mich bedanken dafür, das Du gerade in der ersten Zeit, in der ich mich erst mit dem Zebrafischmodel einarbeiten musste, die Anzucht meiner Fische mit übernommen hast und mir die theoretischen Grundlagen beim Injizieren gezeigt hast, dem Kanülen zieht und allem, was man zum Injizieren benötigt.

Timo Fritsch möchte ich mich bedanken dafür das Du auch Zebrafische für mich angezogen hast in der ersten Zeit und mir die Haltung und Verpaarung gezeigt hast.

Bei **Prof. Dr. Marcus Fulde, Prof. Dr. Manfred Rohde** und **Dr. Oliver Goldmann** möchte ich mich für die Anregungen im Thesis Komitee bedanken und für Eure Unterstützung mit Eurer Expertise und nicht zuletzt auch bei **Prof. Dr. Manfred Rohde** für die hervorragenden EM-Bilder, die so manche Fluoreszenzaufnahme hinten an stehen lassen.

Prof. Dr. Reinhard Schneppenheim, PD Dr. Maria Brehm, Gesa König und **Tobias Obser** vom UKE Hamburg möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und die Unterstützung mit rekombinanten Proteinen des VWF bedanken.

Bei **Prof. Dr. Sven Hammerschmidt** und **Dr. Thomas Kohler** von der Universität Greifswald möchte ich mich für die großartige Kooperation, die zu Verfügung Stellung von Pneumokokken Stämmen und Mutanten sowie den Biacore-Messungen bedanken, die die Arbeit bereichert haben.

Bei **Dr. Werner Tegge** vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig und **Dr. Ronald Frank** möchte ich mich bedanken für die Erstellung der Spot-Membranen und der synthetischen Proteine für meine Arbeit.

Bei **Dr. Jürgen Moser** möchte ich mich für die Unterstützung bei dem Umgang mit PyMol und seinen Rat bei Fragen zur Protein-Interaktion bedanken.

Bei der **AG Maja, Dr. Marina Jahn, Katrin Müller, Stefan Barthels, Davina Hiller und Toni Mingers** sowie **Kim E. Rennhack** aus der Gruppe José M. Borrero de Acuña möchte ich mich für die freundschaftliche und herzliche Aufnahme im letzten Jahr bedanken. Sei es bei der AG-Tour zum Weihnachtsmarkt oder bei unseren diversen Billard-Abende nach Feierabend im Institut mit Kochen, Billard und Musik. Danke für die schöne Zeit mit euch im Labor wie außerhalb.

Bei **Dr. Florina Bitter** und **Dr. Debora Reichmann** möchte ich mich für den Start meiner wissenschaftlichen Arbeit mit meiner Bachelorarbeit bedanken. Ihr hab mich nicht nur beeindruckt, sondern auch inspiriert und jederzeit unterstützt gerade auch Debsi in der Zeit in der Mein Vater starb.

Bei meiner **Mutter Christiane Jagau** und meinem Vater **Axel Jagau, der** meinem 2010 innerhalb eines Jahres verstarb, möchte ich mich bedanken. Ihr habt mit viel Liebe und Verständnis mich zu Jemandem erzogen, der auch gegen den Strom schwimmt, wenn mein Herz & Verstand mir sagen, dass es mir richtiger erscheint. Das Leben kann innerhalb von einem Jahr zu Ende sein und das Ende alles andere als schnell und schmerzlos. Danke auch für diese traurige, aber wichtige Erfahrung. Nichts was man schaffen kann und tun möchte, auf morgen aufzuschieben. Das Leben ist hier und jetzt. Danke auch an meine Mutter, dass du immer ein bedingungsloser und verständnisvoller Rückhalt bist.

Meiner noch guten Freundin **Katharina Hübner** möchte ich danken für die Schöne Zeit und das Verständnis während unserer 11 Jahre. Danke auch für die Rechtschreibkorrektur dieser Arbeit.

Ebenso danke an meine Freunde **Marcus** und **Sarah**, die trotz der kurzen Zeit sofort da waren und meine Arbeit am Wochenende und abends nach Ihrer Arbeit auf Rechtschreib- und Grammatikfehler korrigiert haben. Wer Freunde wie euch hat, weiß das es etwas gibt, was man für Geld nicht kaufen kann. Engagement aus Überzeugung und Freundschaft...diesen Text haben Sie nicht korrigiert...man möge es mir nachsehen ;-)

Inhalt

Vorveröffentlichungen der Dissertation	2
Danksagung.....	5
Zusammenfassung.....	14
Abstract	15
1 Einleitung.....	16
1.1. Auftreten und Virulenz von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	16
1.1.1. Charakteristika von <i>S. pneumoniae</i>	16
1.1.2. Vorkommen von <i>S. pneumoniae</i> und medizinische Bedeutung.....	17
1.1.3. Virulenzfaktoren von Pneumokokken.....	22
1.1.4. Die oberflächen-assoziierte Enolase als multifunktionales Moonlighting-Protein 26	
1.1.5. Epidemiologie und Pathogenese von <i>S. pneumoniae</i>	28
1.2. Der humane Von Willebrand Faktor und seine Bedeutung in der Pathogenese.....	32
1.2.1. Vorkommen und Funktion des Von Willebrand Faktor.....	32
1.1.4. Aufbau und strukturelles Verhalten des vWF	35
1.2.2. Interaktionen des VWF im Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen	36
1.3. Die Flusskultivierung von Endothel für die Pneumokokken-Infektion.....	37
1.4. Die Zebrafischlarven als <i>in vivo</i> Modell für kardiovaskuläre Erkrankungen im Menschen.....	38
2 Ziele dieser Arbeit.....	41
3 Materialien und Methoden.....	42
3.1. Materialien und Geräte	42
3.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	42
3.1.2. Bakterienstämme und Zelllinien	44
3.1.3. Antibiotika, Enzyme und Antikörper	47
3.1.4. Medien, Puffer und Färbelösungen	49
3.2. Mikrobiologische Methoden.....	55

3.2.1.	Kultivierung von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	55
3.2.2.	Kryokonservierung von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	55
3.2.3.	Hitzeinaktivierung von Pneumokokken	55
3.2.4.	Inkubation der Pneumokokken mit human VWF zur Vorbereitung der Infektionsanalysen	56
3.2.5.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	56
3.3.	Proteinbiochemische Methoden	56
3.3.1.	Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>	56
3.3.2.	Zell-Aufschluss über French Press und vorbereiten für die Aufreinigung	57
3.3.3.	Affinitätschromatographische Aufreinigung des His6-getaggten Eno-Proteins von <i>S. pneumoniae</i>	57
3.3.4.	Proteinkonzentrations-Bestimmung nach Bradford	58
3.3.5.	Proteinauftrennung mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese	58
3.3.6.	Coomassie-Brilliant-Blue- und Silbernitratfärbung	59
3.3.7.	Proteindetektion und Interaktionsstudien nach Western Blot-Immobilisierung und Peptide Spot Assay	60
3.3.8.	VWF Bindungsstudien mit der bakteriellen Enolase in Peptid-Spot-Arrays	60
3.3.9.	VWF Bindungsstudien mit der bakteriellen Enolase unterteilt in Bindungsmotive als Peptid-Array	61
3.3.10.	Densitometrische Analyse der Peptid-Spot- und Peptid-Array-Membranen	63
3.3.11.	Darstellen der Eno-Molekülstruktur mit der Software PyMol	63
3.3.12.	Microscale Thermophorese (MST) zur Charakterisierung der VWF-Eno-Interaktion	64
3.2.13	Surface Plasmon Resonanz-Messung (SPR) zur Charakterisierung der VWF-Eno-Interaktion	65
3.4.	Molekularbiologische Methoden	66
3.4.1.	Transformation von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	66
3.4.2.	Isolation genomischer DNA aus <i>S. pneumoniae</i>	67

3.4.3.	Polymersase Kettenreaktion (PCR).....	68
3.4.4.	DNA-Gelelektrophorese.....	69
3.5.	Zellkulturmethoden und Infektionsversuche	69
3.5.1.	Kultivierung von primären Endothelzellen	70
3.5.2.	Kultivierung von THP-1 Zellen	71
3.5.3.	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	71
3.5.4.	Untersuchungen zur Pneumokokken-Phagozytose durch THP-1 Zellen	72
3.5.5.	Zellkulturinfektions-Analysen mit humanem Endothel	74
3.5.6.	Durchführung von Zellkultur-Infektionsanalyse in HUVECs mit VWF-Bindungsmodulatoren	75
3.5.7.	Differenzielle Immunfluoreszenz-Färbung (DIF)	77
3.5.8.	Zellkulturanalysen nach definierter Flusskultivierung.....	78
3.5.9.	Infektionsanalysen unter Fluss-Bedingungen	80
3.6.	Das Zebrafisch <i>in vivo</i> Hämostase-Modell.....	81
3.6.1.	Verwendete Zebrafisch-Stämme und Anzucht der Zebrafisch-Larven.....	82
3.6.2.	Durchführung der Interaktion- und Infektionsstudien im Zebrafisch-Modell ...	82
3.6.3.	Immunfluoreszenz-Detektion der Pneumokokken und des VWF nach Infektion der Zebrafischlarven.....	84
3.6.4.	Fluoreszenzmikroskopie.....	85
4	Ergebnisse	86
4.1.	Untersuchung der Interaktion von Pneumokokken mit VWF zur Biochemie der Bindungen und Effekten in Zellkultur als auch im <i>In vivo</i> Model Zebrafisch	86
4.1.1.	Analyse der VWF-Bindung an Pneumokokken	87
4.1.2.	Verifizierung der Pneumokokken-Enolase VWF-Bindungsproteine.....	94
4.1.3.	Optimierung der Messparameter zur Bindungsanalyse durch Microscale Thermophorese	96
4.1.4.	SPR-Messung zur Ermittlung der Bindungsparameter der Interaktion zwischen Enolase und VWF	100

4.1.5.	Eno-Peptid-Spotmenbran Analyse zur Auffindung von VWF Interaktionspeptiden.	102
4.1.6.	Identifizierung der Eno-Bindungsdomäne des VWF	105
4.2.	Infektionsversuche unter dem Einfluss einer VWF Präinkubation von Pneumokokken mit humanen Zellen	109
4.2.1.	Einfluss einer Pneumokokken-VWF-Präinkubation auf die Phagozytose von THP-1-Makrophagen.....	110
4.3.	Zellkulturinfektionsstudien zur Analyse der Funktion des VWF auf die zelluläre Adhärenz und Internalisierung von Pneumokokken	114
4.3.1.	Einfluss der VWF-Präinkubation auf die bakterielle Adhärenz und Internalisierung in der statischen Zellkultur von Endothelzellen.....	114
4.3.2.	Nähere Charakterisierung der VWF-vermittelten Adhärenz durch Inhibitionsstudien mit Bindungs-Modulatoren	117
4.4.	Elektronenmikroskopische Visualisierung der Pneumokokken-VWF-Interaktion.	127
4.5.	Erstellung von RFP-exprimierenden Pneumokokken-Stämmen zur mikroskopischen Visualisierung in Echtzeit.....	129
4.6.	Visualisierung der Pneumokokken-Adhärenz an HUVEC in einer Flusskultivierungs-Infektion.....	131
4.7.	Auswirkungen der VWF-vermittelten Pneumokokken-Adhärenz im <i>in vivo</i> Modell der Zebrafischlarve	140
5	Diskussion	150
5.1.	Charakterisierung und Vergleich der bakteriellen VWF-Bindungsproteine	150
5.2.	Humaner VWF fördert die Phagozytose bei THP-1 Makrophagen-ähnlichen Zellen	158
5.3.	Einfluss der bakteriellen VWF-Interaktion auf die zelluläre Adhäsion	160
5.4.	Bedeutung der Scherstress-induzierten VWF-Elongation für die Interaktion mit Pneumokokken und Auswirkung der VWF-vermittelten Adhärenz im komplexen <i>in vivo</i> System.....	164
6	Anhang	170

6.1.	Photometrische Bestimmung der Zellzahl.....	170
6.2.	In digitaler Form auf der CD hinterlegte Zeitreihenaufnahmen.....	171
6.3.	Daten aus der Biochemischen Charakterisierung der VWF-Eno Interaktion.....	173
6.4.	Daten aus der Analyse der Bindungskinetik zwischen Eno und VWF-Monomer der MST.....	176
6.5.	Daten aus der Analyse der Bindungskinetik zwischen Eno und VWF-Monomer der SPR	179
6.6.	Repräsentative Flussinfektions-Übersichtsaufnahmen bei den verschiedenen Versuchvarianten.....	181
7	Abkürzungsverzeichnis	197
8	Literaturverzeichnis	199
9	Abbildungsverzeichnis.....	220
10	Tabellenverzeichnis.....	224
	Curriculum Vitae	225

Zusammenfassung

Streptococcus pneumoniae besiedelt den oberen Respirationstrakt des Menschen als opportunistisches Pathogen. Die auch als Pneumokokken bezeichneten Bakterien lösen vor allem bei Kindern, älteren Menschen und immunsupprimierten Personen bis zu 50% aller ambulant erworbenen Lungenentzündungen aus. Im Infektionsverlauf migriert der Erreger durch das alveoläre Lungenepithel und kann sich systemisch im Gefäßsystem ausbreiten. Die Folge sind Septikämien und Meningitiden, die auch Jahre nach der Infektion zu lebensbedrohlichen kardiovaskulären Komplikationen führen können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass klinische Pneumokokkenisolate das humane Glykoprotein „von Willebrand Faktor“ (VWF) binden. Hierbei handelt es sich um ein mechanoresponsives Protein der Hämostase. Durch Oberflächenplasmonresonanz-(SPR) und Microscale Thermophoresis-(MST) Studien konnte die oberflächenassoziierte Enolase der Pneumokokken als bakterielles VWF-Bindungsprotein identifiziert werden und eine Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich ermittelt werden. Die Ergebnisse eines Peptid-Spot Arrays der Enolase gaben erste Hinweise auf ein mögliches VWF-Bindungsmotif, dass eine strukturelle Bindungsfurche in der oktameren Molekülstruktur der Enolase bildet. Neben den biochemischen Studien konnte in Zellkultur-basierten Infektionsstudien eine erhöhte Phagozytose von einer VWF-Präinkubation Bakterien durch Makrophagen festgestellt werden. Zudem konnte VWF als Adhäsionskofaktor charakterisiert werden, der die bakterielle Anheftung an Endothelzellen in Heparin-sensitiver Weise vermittelt. In SPR-Studien konnte zudem eine starke Interaktion zwischen der immobilisierten Enolase und der heterolog exprimierten A1-Domäne des VWF bestätigt und näher charakterisiert werden. Um die VWF-Interaktion unter Scherstress-Bedingungen im Blutgefäßsystem simulieren zu können wurde ein Mikrofluidik System (ibidi®) etabliert. Die mikroskopische Visualisierung lässt rot-fluoreszierende Pneumokokken erkennen, die an den VWF-Fäden im konstanten Scherstress von 10 dyn/cm² über einen Zeitraum von bis zu 25 min stabil adherierten. Darüber hinaus rekrutierten Pneumokokken nach Injektion in 5-Tage alte Zebrafisch-Larven das endogene VWF auf ihrer Oberfläche und adherierten *in vivo* an das Gefäßendothel. Nach VWF Präinkubation konnte die Bildung von Bakterien-Aggregaten im Gefäßsystem der Zebrafischlarven nachgewiesen werden. Diese Aggregate sind von hoher pathophysiologischer Relevanz, da sie zu thrombotischen Gefäßverschlüssen führen können. Insgesamt beschreiben die Ergebnisse dieser Arbeit eine neue, medizinisch hochrelevante Erreger-Wirt-Interaktion.

Abstract

Streptococcus pneumoniae can colonize the upper respiratory tract as a human opportunistic pathogen. The so called Pneumococci cause mild infections like otitis media or sinusitis, as well as community acquired pneumonia (CAP). Pneumococci are the infective agent in 50% of all pneumonia in children, elderly people and immune suppressed patients. During the infection, Pneumococci transmigrate through the alveolar epithelium and spread into the vascular system thereby causing septicaemiae and meningitides, which can induce life threatening cardiovascular complication even years after infection. Results on this PhD thesis confirm the binding of the human glycoprotein “Von Willebrand factor” (VWF) to clinical Pneumococcus isolates. VWF is known as mechanoresponsive protein of the haemostasis. Surface-plasmon-resonanz- (SPR) and microscale thermophoresis-approaches identified the surface localized Enolase of *S. pneumonia* as VWF-binding protein and determined a dissociation constant within the nanomolar range. Peptide-spot-array results pointed out elucidated a putative VWF- binding motif, which forms a structural binding-pocket at adjacent sides of two monomers of the octameric pneumococcal Enolase.

In addition to the biochemical characterization, functional studies were performed to analyse pathophysiological consequences of the VWF binding of *S. pneumoniae*. Results of cell-culture infection analyses identified VWF as adhesion cofactor mediating pneumococcus adhesion to the endothelial cell surface in heparin-sensitive manner. SPR-analyses demonstrated a strong interaction between the immobilized Enolase and the heterologous expressed A1-domain of VWF. With the aim to analyse the VWF-interaction in shearstress-condition, which are present in the human bloodstream, a microfluidic system (ibidi) was established. This system enabled the generation of multimerised VWF-strings on histamine-stimulated endothelial cells. Microscopic analyses visualized a stable, 25 min. lasting attachment of red fluorescent Pneumococci to VWF strings at a shear force of 10 dyne/cm². Furthermore, the recruitment of zebrafish-derived VWF on the surface of pneumococci and bacterial adherence to the vascular endothelium was detected in *in vivo*-infection analyses of 5-day old zebrafish larvae. After VWF preincubation, the formation of large bacterial aggregates within the vascular system of the larvae could be visualized. These aggregates are of high pathophysiological relevance, since they can cause thrombus-like vascular occlusion. In conclusion, the results of this thesis describe a new pathogen-host interaction of highest medical relevance.

1 Einleitung

1.1. Auftreten und Virulenz von *Streptococcus pneumoniae*

1.1.1. Charakteristika von *S. pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae gehört zur Klasse der Bacilli und zu der Familie der *Streptococcaceae*. George Miller Sternberg und Louis Pasteur isolierten und beschrieben die Diplokokken unabhängig voneinander bereits im Jahr 1880 (Austrian, 1999). Bereits seit 1974 werden die Bakterien der Gattung Streptokokken zugeordnet (Deibel und Seeley 1974). Es handelt sich bei *S. pneumoniae* um Gram-positive lanzettförmige bis ovale Kokken, die als Diplokokken oder auch in kurzen Ketten vorkommen. Sie haben eine Größe von etwa 0,5-1,25 μm (Vos *et al.*, 2009). Eine Kultivierung von Pneumokokken ist im Labor unter Sicherheitsstufe 2-Bedingungen in Komplexmedien wie dem *Todd Hewitt Broth* (THY)-Medium oder bluthaltigem Medium, wie Columbia-Blutagar mit 5 % Schafblut möglich. In 5%-CO₂-Atmosphäre sind Pneumokokken α -hämolytisch, wenngleich bei langfristiger Kultivierung eine Pneumolysin-bedingte β -Hämolyse zu beobachten ist (Vos *et al.*, 2009). Aufgrund der Ausbildung eines bräunlichen Hämolyse Hofes auf Blutagar werden Pneumokokken zu den „vergrünenden Streptokokken“ gezählt. Die Optochinsensitivität unterscheidet Pneumokokken von anderen Streptokokken der Viridans-Gruppe (Darai *et al.*, 2003). Pneumokokken bilden eine Kapsel aus Polysacchariden, die eine Schutzfunktion vor Phagozytose vermittelt und eine wichtige Virulenz Eigenschaft darstellt (Abbildung 1-1; Austrian, 1981; Hyams *et al.*, 2010; Hammerschmidt *et al.*, 2005).

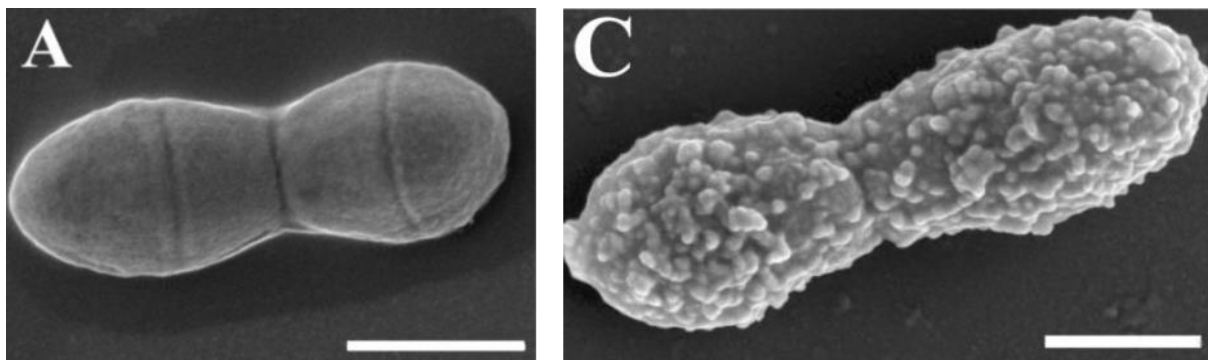


Abbildung 1-1: Unbekapselte und bekapselte Pneumokokken (A) Pneumokokken Diplokokke ohne Kapsel und (C) mit Polysaccharidkapsel. Aus Hammerschmidt *et al.*, 2005. Maßstabsbalken entspricht 0,5 μm .

Aufgrund der biochemischen Zusammensetzung der Polysaccharidkapsel sind mittlerweile über 97 verschiedene *S. pneumoniae* Serotypen bekannt (del Amo *et al.*, 2016). Zudem wurden in den letzten Jahren auch einige nicht-typisierbare Pneumokokken beschrieben. Auf festem Nährmedium wachsen Kolonien bekapselter Stämme schleimig und glänzend-glatt. Kolonien unbekapselter Stämme sind dagegen glanzlos und sehen rau aus (Hahn *et al.*, 2008). Pneumokokken weisen eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von DNA auf, wodurch die genetische Manipulation sehr erleichtert wird. Die Kompetenz wird in bestimmten Wachstumsphasen durch ein intrazelluläres Signalprotein induziert, das abhängig von der Zelldichte und der Wachstumsphase exprimiert wird (Tomasz und Hotchkiss, 1964). Das Signalprotein ist ein 17 Aminosäuren umfassendes, kompetenzstimulierendes Peptid (*competence stimulating peptide*, CSP; Havarstein *et al.*, 1995) und wird von dem Gen *comC* kodiert im *com*-Operon codiert. Das *com*-Operon enthält weitere Kompetenz-assoziierte Gene. So kodieren *comD* und *comE* die Histidinkinase und den Responseregulator eines Zwei-Komponenten-System (Pestova *et al.*, 1996 und Cheng *et al.*, 1997). Es sind zwei Sequenzvarianten des Signalpeptides bekannt, die als CSP1 und CSP2 entsprechend der Bindungsstelle der Transmembran-Histidinkinase die Kompetenz bei unterschiedlichen Stämmen induzieren (Pozzi *et al.*, 1996).

1.1.2. Vorkommen von *S. pneumoniae* und medizinische Bedeutung

S. pneumoniae kommen natürlicherweise in den oberen Respirationstrakt des Menschen vor. Sie besiedeln zusammen mit anderen Bakterien den Nasenrachenraum als Kommensale (Hahn *et al.*, 2008; Weiser, 2010). Pneumokokken sind auch als Tierpathogen bekannt und die Pathogenese von *S. pneumoniae* wird in diversen Tiermodellen, darunter Primaten, Schweine, und Mäuse untersucht (Chiavolini *et al.*, 2008). Die Infektion von Tieren durch *S. pneumoniae* wird als Anthroponose in Folge des engen Kontaktes zwischen Mensch und Tier bei der Haltung diskutiert. Es handelt sich hierbei jedoch um Einzelfälle (Sting und Schwabe, 2011). Pneumokokken werden normalerweise durch Tröpfcheninfektionen von Mensch zu Mensch übertragen. Der Anteil an Pneumokokken-Trägern in der Gesellschaft ist bei Kleinkindern vergleichsweise hoch und nimmt mit dem Alter ab. Unter 10 % der Erwachsenen sind mit Pneumokokken besiedelt (Kadioglu *et al.*, 2008). Diese Besiedlung verläuft bei gesunden Menschen asymptomatisch. Bei Kleinkindern, älteren Menschen und immunsupprimierten Personen kann eine Kolonisierung jedoch zu einem Krankheitsausbruch führen. Gelingt es den Bakterien sich übermäßig zu vermehren und an Epithelzellen zu binden, lösen sie zum einen

milde Infektionen wie Mittelohrentzündungen oder Nebenhöhlenentzündungen aus, zum anderen aber auch lebensbedrohliche Infektionen wie Lungenentzündungen, Meningitis und Sepsis (Bogaert *et al.*, 2004). Diese schweren Infektionen, bei denen die Pneumokokken in ansonsten sterile Bereiche des Körpers vordringen, werden invasive Pneumokokken-Erkrankungen (IPD für *invasive pneumococcal disease*) genannt. Eine Hirnhautentzündung durch *S. pneumoniae* verursacht außerdem bei ca. 30 % der überlebenden Patienten Langzeitfolgen wie Hörverlust und eine Beeinträchtigungen des Nervensystems (Mook-Kanamori *et al.*, 2011). Infektionen durch Pneumokokken führen weltweit zu Todesfällen, besonders betroffen sind die Entwicklungsländer. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) waren im Jahr 2015 16 % der Todesfälle bei Kindern unter 5 Jahren auf Pneumonien zurückzuführen, zu deren Hauptursache der Erreger *S. pneumoniae* zählt (WHO, 2016). Ebenso ist *S. pneumoniae* mit etwa 50 % international der häufigste Erreger einer ambulant erworbenen Pneumonie (CAP für *community acquired pneumonia*), gefolgt von Influenza A-Viren mit ca. 18 % (Abbildung 1-2).

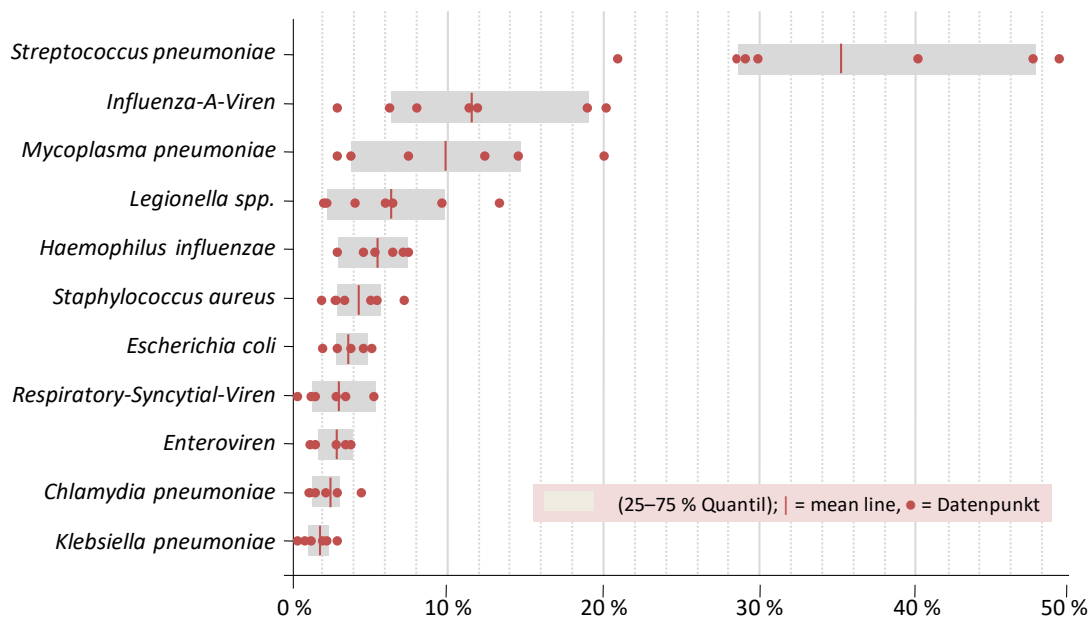


Abbildung 1-2: Häufigkeit der verschiedenen mikrobiellen Verursacher von Pneumonien

Dargestellt sind die Häufigkeiten, mit denen verschiedene Pathogene ambulant erworbene Pneumonien auslösen. Die Daten basieren auf den Informationen des CAPNETZ von 21.01.2006 (www.capnetz.de: „community-acquired pneumonia competence network“, unterstützt vom Bundesministerium für Bildung und Forschung).

Die antibiotische Behandlung von Infektionen mit Pneumokokken wird durch β -Lactam-Allergien und Resistenzentwicklungen erschwert. Die relative Häufigkeit von Penicillin- und Makrolidresistenzen bei *S. pneumoniae* in Europa sind in Abbildung 1-3 dargestellt.

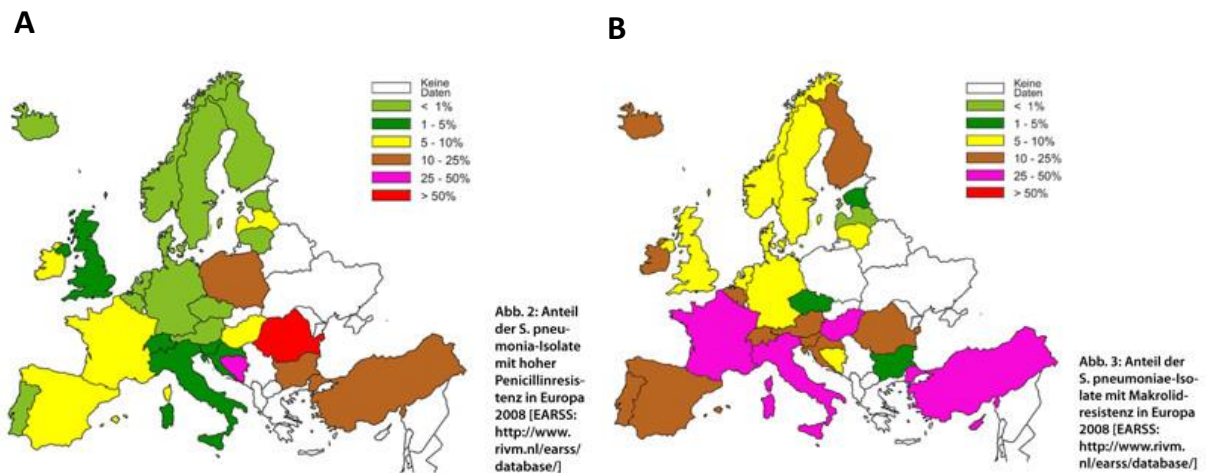


Abbildung 1-3: Relative Häufigkeit von auftretenden Penicillin- und Makrolidresistenzen bei *S. pneumoniae* in Europa

(A) Anteil der *S. pneumoniae*-Isolate mit Penicillin-Resistenz in Europa 2010. (B) Anteil der *S. pneumoniae*-Isolate mit Makrolid-Resistenz in Europa 2010. (European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2011).

Zudem werden aufgrund der natürlichen Kompetenz von Pneumokokken Antibiotikaresistenzen sehr schnell innerhalb klonaler Linien etabliert. So kam es nach der übermäßigen Verwendung besonders von Penicillin, aber auch anderen Antibiotika zur Entstehung einer breiten Population multiresistenter Pneumokokken (Jacobs *et al.*, 1978). Im Rahmen der Präventionsmaßnahmen soll die Infektionsrate durch Impfung verringert werden. Bei der Herstellung von Impfstoffen spielt die Polysaccharidkapsel von *S. pneumoniae* eine wichtige Rolle. Anhand der biochemischen Zusammensetzung werden die verschiedenen Serotypen der Pneumokokken unterschieden. Sämtliche der zurzeit auf dem Markt erhältlichen Impfstoffe basieren auf den Polysacchariden der am häufigsten in Infektionen auftretenden Serotypen und stellen eine aktive Immunisierung da. Es gibt zwei verschiedene Impfstoffvarianten. Das *pneumococcal polysaccharide vaccine 23* (PPV23) enthält Polysaccharide von 23 Serotypen und schützt vor den Serotypen: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F und 33F (MSD Sharp & Dohme GmbH, 2017). Die zweite Variante ist ein konjugierter Impfstoff. Polysaccharide von 13 verschiedenen Serotypen sind an das inaktivierte Diphtherie-Toxin CRM₁₉₇-Protein gekoppelt. Das *pneumococcal*

conjugate vaccine 13 (PCV13) immunisiert gegen die Serotypen: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F und 23F (Pfizer Pharma GmbH, 2017). Zuvor gab es bereits 7-, 10-, und 11-valente Konjugatimpfstoffe, die um zusätzliche Serotypen erweitert wurden. Durch die Kopplung der Pneumokokken-spezifischen Antigene an ein inaktiviertes Toxin wird ein T-Zell-abhängigen Langzeitschutz generiert. Statistische Erhebungen zum Impfschutz zeigen, dass in den Vakzinierungsgebieten die Anzahl der Krankheitsausbrüche und sogar die Besiedlung durch Serotypen, die von PCV13 abgedeckt werden, deutlich zurückgegangen sind (Pilishvili *et al.*, 2010). Das Robert-Koch-Institut (RKI) hat 2007 auch in Deutschland ein Überwachungssystem zur Erfassung von IPDs eingeführt. Ziel des Überwachungssystems namens PneumoWeb ist es, die Alters- und Serotypverteilung bei den Erkrankungen zu dokumentieren. Durch die Einführung der Kleinkinderimpfung im Jahr 2006 konnte die Beteiligung an IPDs durch bestimmte Serotypen reduziert werden (Abbildung 1-4).

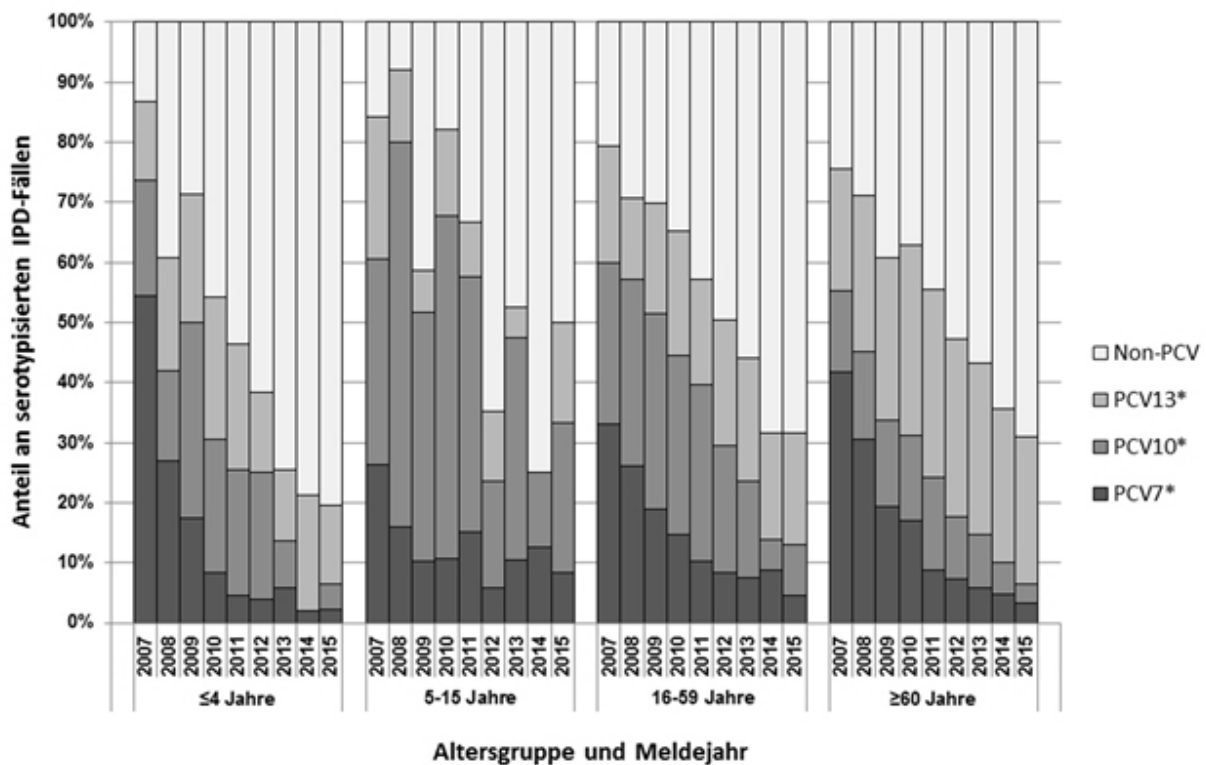


Abbildung 1-4: Serotypverteilung bei invasiven Pneumokokken-Erkrankungen

Gezeigt ist die Serotypverteilung bei Pneumokokkeninfektionen in verschiedenen Altersgruppen und deren Meldejahr. Die mit PCV7-gekennzeichneten Balken beschreiben die Serotypen, die im 7-valenten Konjugatimpfstoff enthalten sind. PCV10 zeigt die Serotypen an, die sich zusätzlich zu PCV7 im 10-valenten Konjugatimpfstoff befinden. PCV13 steht entsprechend für die Serotypen, die neben den PCV10 Serotypen im 13-valenten Impfstoff enthalten sind. Mit Non-PCV gekennzeichneten Anteile sind Serotypen, die durch keinen Konjugatimpfstoff abgedeckt werden (RKI, 2007).

Die Pneumokokken-Schutzimpfung für Kinder ist mittlerweile von der Ständigen Impfkommission des RKI (STIKO) in die Liste der Impfeempfehlungen aufgenommen worden.

Wie in der Abbildung 1-5 zu erkennen ist, tritt durch die flächendeckende Impfung von Kindern auch ein Herdenschutzeffekt für ältere Menschen ein (RKI, 2007). Neuere Studien zeigen jedoch auch eine Impfstoff-vermittelte Serotyp-Verschiebung, die zu einer Erhöhung an Infektionen durch Stämme führt, deren Serotypen nicht von dem 13-valenten Impfstoff abgedeckt werden (Sheppard *et al.*, 2016). Dieser sogenannte „Serotyp-Switch“ wurde erstmals im Jahr 2000 in den USA nach Einführung des 7-valenten Pneumokokkenvakzins beschrieben (Ampofo *et al.*, 2012, Abbildung 1-5).

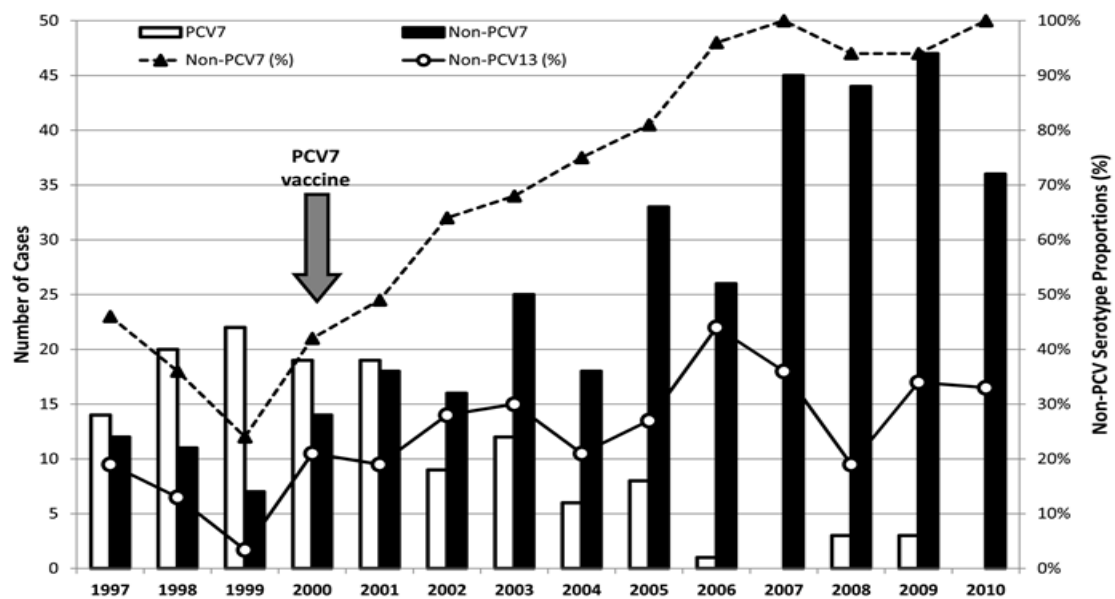


Abbildung 1-5: Impfstoff-vermittelte Verschiebung der vorherrschenden Pneumokokken-Serotypen
 Dargestellt wurde der prozentuale Anteil von Krankheitsfällen bei Kindern in den USA von 1997 bis 2010 und den nachgewiesenen Serotypen. Die Balken unterscheiden in Serotypen, die im 7-valenten Impfstoff (PCV7) abgedeckt werden und Serotypen, die nicht im Impfstoff enthalten sind (Non-PCV7). Zusätzlich werden auch Fälle gezeigt in denen Serotypen auftraten, die nicht im 13-valenten Impfstoff (PCV13) enthalten waren. Der Pfeil markiert die Einführung des Impfstoffes PCV7 im Jahr 2000 (aus: Ampofo *et al.*, 2012).

Die in Abbildung 1-5 dargestellte Serotyp-Verteilung zeigt deutlich, dass nach der Einführung des 7-valenten Vakzins im Jahr 2000 (Pfeil), die Anzahl der in den Infektionen nachgewiesenen Serotypen des PCV7-Impfstoffs abnimmt. Demgegenüber nimmt die Anzahl der nicht im PCV7-Impfstoff enthaltene Serotypen von ca. 14 % im Jahr 2000 auf 72 % im Jahr 2010 zu. Zudem werden immer mehr Pneumokokken-Erkrankungen durch nicht-typisierbare Pneumokokken ausgelöst, von denen ein großer Teil keine Kapselexpression aufweist (Keller *et al.*, 2016).

Um dieser Serotyp-Verschiebung entgegenzuwirken, werden die Impfstoffe immer wieder mit Polysacchariden der jeweils vorherrschenden Serotypen ergänzt. Diese Erweiterung ist jedoch nur begrenzt möglich und vermittelt nur gegen die jeweiligen Kapsel-Serotypen einen effektiven Infektionsschutz. Für eine langfristige und umfassende Schutzwirkung müsste ein Impfstoff entwickelt werden, der nicht auf bestimmten Kapselpolysacchariden basiert, sondern eine ubiquitär, von allen Pneumokokken exprimierte, immunogene Oberflächenkomponente erkennt und damit auch eine Immunität gegen unbekapselte Pneumokokken vermittelt. Bei der Herstellung von Impfstoffen gegen Pneumokokken muss ebenso beachtet werden, dass es sich um Kommensale handelt, deren Nischenbesiedelung unsere Rachenraumes auch einen Schutz vor Infektionen mit aggressiveren Pathogenen bewirkt. Die Auswirkungen einer umfassenden Pneumokokken-Immunität auf das normale Mikrobiom und die damit verbundenen Gesundheitseffekte können nicht vollends abgeschätzt werden (McDaniel und Swiatlo, 2016). Insgesamt verdeutlichen sowohl die Resistenzproblematik als auch die Reaktionen auf die Einführung verschiedener Impfstoffe die Dringlichkeit eines detaillierten Verständnisses zur Pathogenese. Die Entwicklung effektiver Infektionstherapien und besonnener Präventionsmaßnahmen erfordert eine umfangreiche Aufklärung der Erreger-Wirt-Interaktionen.

1.1.3. Virulenzfaktoren von Pneumokokken

Pneumokokken exprimieren eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die es ihnen auf unterschiedlichste Art ermöglichen, die menschlichen Atemwege zu besiedeln, an Epithelzellen zu binden und in das Gewebe zu disseminieren. Die Polysaccharidkapsel (Abbildung 1-1) ist einer der wichtigsten Virulenzfaktoren. Sie schützt die Pneumokokken vor Phagozytose und ist essentiell für die Kolonisierung (Magee und Yother, 2001). Pneumokokken können die Expression der Kapselpolysaccharide regulieren. Durch spezielle, auf die Kapselvisualisierung ausgerichtete elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten Hammerschmidt, Rohde und Mitarbeiter im Jahr 2005 nachweisen, dass im Blutkreislauf zirkulierende, stark bekapselte Pneumokokken während des Anheftungsprozesses an Epithelzellen nur noch eine sehr dünne Polysaccharidschicht aufweisen (Hammerschmidt *et al.*, 2005; Abbildung 1-6 A + B).

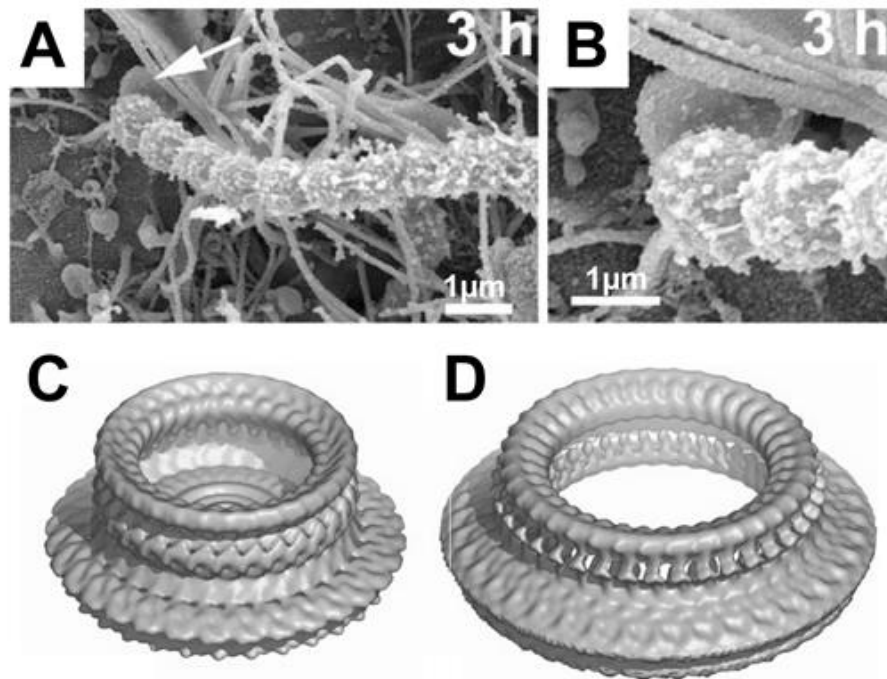


Abbildung 1-6: Polysaccharidkapsel adhärenter Pneumokokken und Struktur einer Pneumolysin-Pore

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von adhärenenten Pneumokokken an Epithelzellen. Die Kapselstruktur wurde durch eine spezielle LRR-White-Methode dargestellt. (B) Vergrößerte Abbildung des mit dem weißen Pfeil in A bezeichneten Bereichs (aus: Hammerschmidt *et al.*, 2005). Maßstabsbalken = 1 µm. (C) Röntgenkristall-Struktur der Vorstufe einer oligomerisierten, ringförmigen Pneumolysin-Pore. (D) Durch Konformationsänderung der Oligomere wird die Lipidmembran auseinandergedrückt und die Pore in die Lipiddoppelschicht integriert (aus: Tilley *et al.*, 2005).

Die Interaktion zwischen bakteriellen Adhäsinen der Pneumokokken-Oberfläche und Epithelzellrezeptoren wird durch eine Reduktion der Kapsel begünstigt (Hammerschmidt *et al.*, 2005). Das Endo-Zytotoxin Pneumolysin wurde ebenfalls als ein wichtiger Virulenzfaktor der Pneumokokken charakterisiert. Das Toxin wird von allen Stämmen mit unterschiedlich starker Aktivität exprimiert und wird erst im Zuge autolytischer Prozesse und im Verlauf der Zellteilung aus dem Zytoplasma freigesetzt. Pneumolysin bindet an das Cholesterin der humanen Zellmembranen und induziert durch Oligomerisierung von bis zu 100 Toxinuntereinheiten eine mechanische Porenbildung (Mariott *et al.*, 2008). Durch eine Konformationsänderung des ringförmigen Porenkomplexes entsteht eine 230-260 Å große Pore in der Lipiddoppelschicht, die zu einer massiven Beeinträchtigung der Zellintegrität führt und den Membranpotentialgradienten zerstört (Abbildung 1-6 C, D; Tilley *et al.*, 2005; Marshall *et al.*, 2015). Die unmittelbaren Folgen sind der Stillstand des Metabolismus der Zelle und das Einleiten des apoptotischen Zelltods. Neueren Studien zufolge sind neutrophile Granulozyten besonders sensitiv gegenüber der zytolytischen Aktivität des Pneumolysins. Durch die Zell-Lyse wird neutrophile Elastase freigesetzt, die wiederum Makrophagen inaktiviert und das

umgebende Gewebe schädigt. Die zytotoxische und zytolytische Aktivität des Pneumolysins führt daher zur Schwächung wichtiger Bestandteile der humanen Immunabwehr (Domon *et al.*, 2016). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Pneumolysin auch die Exozytose von Von Willebrand Faktor (VWF) beinhaltenen sekretorischen Vesikeln, den Weibel-Palade-Bodies (WPB) von Endothelzellen induziert (Lüttge *et al.*, 2012).

Neben diesen zwei Hauptvirulenzfaktoren ist eine Vielzahl an Oberflächenproteinen und oberflächenassoziierten Proteinen beschrieben, die ebenfalls zur Virulenz von *S. pneumoniae* beitragen. Im Folgenden werden die wichtigsten Funktionen von einigen der bereits etwas näher charakterisierten Faktoren vorgestellt:

Ein wichtiger Bestandteil der Pneumokokkenzellwand ist das an Lipoteichonsäuren-gebundene Phosphorylcholin, welches auch bei anderen Gram-positiven Kommensalen des oberen Respirationstraktes nachzuweisen ist (Kadioglu *et al.*, 2008, Bergmann und Hammerschmidt, 2006). Zum einen vermittelt Phosphorylcholin als Virulenzfaktor die Adhärenz an humane Zellen, zum anderen sind cholinbindende Proteine über Phosphorylcholin nicht-kovalent an der Bakterienoberfläche verankert (Cundell *et al.*, 1995; Bergmann und Hammerschmidt, 2006). Je nach Stamm werden von Pneumokokken 13-16 verschiedene Cholin bindende Proteine produziert (Bergmann und Hammerschmidt, 2006). Dazu zählt z.B. das *Pneumococcal surface protein A* (PspA), dass die bakterizide Wirkung des Lactoferrins im menschlichen Körper blockiert und eine Opsonisierung durch Faktoren des Komplementsystems verhindert (Hammerschmidt *et al.*, 1999; Kadioglu *et al.*, 2008). Das *Pneumococcal surface protein C* (PspC) ist ebenfalls ein Cholin-Bindungsprotein mit einem breiten Spektrum an Bindungsaktivitäten. PspC blockiert die Erkennung durch das Komplementsystem, indem es einen seiner wichtigsten Regulatoren, Faktor H, bindet und dadurch inaktiviert (Agarwal *et al.*, 2010; Dave *et al.*, 2004). Zudem bindet das auch ursprünglich als SpsA bezeichnete PspC an den Immunglobulinrezeptor auf dem oberen Rachenepithel und vermittelt die bakterielle Transzytose (Elm *et al.*, 2004; Dave *et al.*, 2004). Von besonderer Bedeutung für die wissenschaftliche Fragestellung dieser Arbeit ist die Fähigkeit des PspC das humane Glykoprotein Thrombospondin 1 zu binden. Das Thrombospondin 1 vermittelt die Interaktion mit Thrombozyten und bindet sowohl den Von Willebrand Faktor (VWF), als auch Heparin (Binsker *et al.*, 2015). Das Autolysin LytA ist eine Peptidyl-Hydrolase, die bei hohen Bakterienzeldichten zur Autolyse einiger Pneumokokken führt (Eldholm *et al.*, 2009; Mellroth *et al.*, 2012). Der Mechanismus der LytA-vermittelten Lyse von Schwesterzellen wird auch als „Fratricide“, also als Brudermord bezeichnet (Claverys *et al.*, 2007). Es wird vermutet,

dass dieser Mechanismus dazu dient, das Überleben eines Teils der Bakterienpopulationen unter Nährstoff-limitierten oder toxischen Bedingungen zu sichern.

Aus der Gruppe der Lipoproteine sind ebenfalls einige Virulenzfaktoren beschrieben. Lipoproteine sind über aminoterminalen Fettsäuren an der äußeren Phospholipidschicht der Zellwand verankert (Madigan *et al.*, 2013). Das *Putative proteinase maturation protein A* (PpmA) trägt zur Adhärenz von Pneumokokken an das Epithel bei und verhindert eine Makrophagen-vermittelte Phagozytose durch Maskierung der Pneumokokken-Oberfläche (Cron *et al.*, 2009). Bei dem *Streptococcal lipoprotein rotamase A* (SlrA) handelt es sich um ein Protein mit Peptidyl-Prolyl-Isomerase Aktivität, das an der Kolonisierung des oberen Respirationstraktes beteiligt ist. Die genaue Funktion, sowie die Interaktionspartner des SlrA konnten bis jetzt noch nicht ermittelt werden (Hermans *et al.*, 2006). Während der *Pneumococcal nucleoside receptor A* (PnrA) die Funktion als Substratbindungsprotein eines ABC-Transporters zur Nukleosidaufnahme ausübt (Saxena *et al.*, 2015), handelt es sich bei dem Lipoprotein DacB um eine L,D-Carboxypeptidase. Dieses Enzym trägt zusammen mit der D,D-Carboxypeptidase DacA zum Aufbau einer Peptidoglycanschicht bei und ist am Erhalt der Zellintegrität beteiligt (Abdullah *et al.*, 2014). Das Lipoprotein PccL (*Pneumococcal calycin fold containing Lipoprotein*) zählt zur Familie der Lipocaline. Ergebnisse von Infektionsstudien der Arbeitsgruppe von Prof. Hammerschmidt, Universität Greifswald zeigen, dass PccL die Interaktion von Pneumokokken mit Lungenepithelzellen vermittelt und in einem *in vivo* Pneumonie-Mausmodell auch eine Funktion im Verlauf der Pathogenese übernimmt (Abdullah, M. R., Dissertation 2014).

Einige Zelloberflächenproteine sind kovalent über LPxTG-Motif verankert. Hierbei werden Proteine mit dem Aminosäure-Motif Leucin-Prolin-Xaa-Threonin-Glycin von Sortasen in der Peptidoglycanschicht verankert. Die Neuraminidase NanA ist ein solches kovalent verankertes Enzym, das Sialinsäuren von Glykoproteinen, Glykolipiden und Oligosacchariden spaltet. Zusammen mit der nicht-kovalent-verankerten Neuraminidase NanB ist NanA an der Besiedlung der oberen Atemwege beteiligt (Manco *et al.*, 2006 und Parker *et al.*, 2009). Das Plasmin- und Fibronectin-bindende Protein A (PfbA) ist ein weiteres über ein LPxTG-Motif im Peptidoglycan verankertes Oberflächenprotein. Es vermittelt als ein wichtiges Adhäsins die Rekrutierung von Plasminogen aus humanem Plasma und die Bindung der Pneumokokken an Fibronectin der extrazellulären Matrix (EZM) (Yamaguchi *et al.*, 2008). Plasminogen ist ein Fibrinolyse-Proenzym, das durch Aktivatoren in proteolytisch aktives Plasmin gespalten wird.

Plasmin degradiert als Serinproteinase Fibrinthromben und verschiedenen Komponenten der EZM wie z.B. Laminin (Bergmann *et al.*, 2003; 2005; 2007; 2013).

Einige oberflächenassoziierte Virulenzfaktoren weisen keines der bekannten Verankerungskonzepte auf und sind dennoch auf der Oberfläche lokalisiert. Die *Pneumococcal adhesion and virulence factors* PavA und PavB üben essenzielle Funktionen in der bakteriellen Kolonisierung der Atemwege aus und binden in gleicher Weise wie das oben beschriebene PfbA an das EZM-Protein Fibronectin. PavB wurde ebenfalls als Plasminogenbindungsprotein charakterisiert (Holmes *et al.*, 2001 und Jensch *et al.*, 2010). Die Oligopeptidpermease AmiA/AmiB ist ein ABC-Transporter, der zur Nährstoffaufnahme genutzt wird und ebenfalls die Pneumokkenkolonisierung fördert (Kerr *et al.*, 2004). Bei der Enolase (Eno) und der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) handelt es sich um Oberflächenassoziierte Enzyme, die aufgrund ihrer essenziellen Funktionen im Stoffwechsel auch als sogenannte *Moonlighting*-Proteine bezeichnet werden (Bergmann *et al.*, 2001; 2004). Beide Enzyme interagieren mit Plasmin(ogen)-Bindung und nutzen die rekrutierte serinproteolytische Aktivität zur Gewebsdegradation und -dissemination (Bergmann *et al.*, 2005). Aufgrund der hohen Relevanz für diese Arbeit, werden die bereits bekannten Funktionen der Eno im nachfolgenden Abschnitt 1.1.4 im Detail gesondert beschrieben.

Pneumokokken exprimieren auch eine Vielzahl an Bakteriozinen, die in autolytischen Prozessen eine Rolle spielen und auch zur Vermeidung von Nischenbesetzungen durch Bakterien anderer Gattungen eingesetzt werden. Es handelt sich um kleine Peptide, deren Freisetzung durch *Quorum sensing* kontrolliert wird (Kadioglu *et al.*, 2008).

1.1.4. Die oberflächen-assoziierte Enolase als multifunktionales Moonlighting-Protein

Die Enolase (Eno) ist ein zentrales Enzym in der Glycolyse. Seit dem Jahr 1934 ist ihrer Funktion als PhosphoEnolpyruvat-Hydratase von Lohman und Mayerhof bekannt (Lohman und Mayerhof, 1934). Es ist in vielen Organismen eines der häufigsten vorkommenden zytosolischen Proteine. Die Glycolyse, die auch der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg bezeichnet wird, beschreibt den katabolen Abbau von Glucose zu Pyruvat und führt zur Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) als Energie- und Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) als Reduktionsäquivalent (Pancholi, 2001). In diesem Prozess katalysiert die Eno als Hydratase die Dehydrierungsreaktion von 2-Phosphoglycerat zu PhosphoEnolpyruvat unter Abspaltung von H₂O. Als Metalloenzym weist die Eno ein zentrales Mg²⁺-Ion für seine katalytische Aktivität auf. Die Eno hat eine hoch konservierte Sequenz und wird sowohl von Archaeobakterien, als

auch von Säugetieren exprimiert (Piaśt *et al.*, 2005). In Wirbeltieren tritt sie in drei Isoformen auf, der *Eno1* (α -Enolase), *Eno2* (β -Enolase) und *Eno3* (γ -Enolase). Während die *Eno1* in nahezu allen menschlichen Geweben vorzufinden ist, wird *Eno2* hingegen nur in Neuronen und Neuroendocrine-Gewebe gefunden und die *Eno3* hauptsächlich in Muskelgewebe. Alle drei Isoformen zeigen eine hohe Sequenzidentität und ähnliche enzymkinetische Eigenschaften (Fletcher *et al.*, 1976; Giallongo *et al.*, 1986; Feo *et al.*, 1990). Die Eno-Proteine werden im Menschen als Homo- oder Heterodimere gebildet (Fletcher *et al.*, 1976; Kato *et al.*, 1983).

Zudem wurde die Eno unter anderem auch als neurotrophischer Faktor, als Hitze-Schock-Protein und als Hypoxie-Stress-Protein beschrieben (Iida und Yahara, 1985; Takei *et al.*, 1991; Aaronson *et al.*, 1995). Die multiplen Funktionen Eno sind hierbei in vielen Organismen durch ein einziges Gen kodiert und daher auch als funktionelles „gene sharing“ bezeichnet (Piatigorsky, 1998; Jeffery, 1999). Die Eno wird auch auf der Oberfläche von vielen Organismen exprimiert und übernimmt dort als sogenanntes „Moonlighting-Protein“ auch andere Funktionen unter anderem in der Pathogenese (Bergmann *et al.*, 2001, 2005; Ramos *et al.*, 2012). Die α -Eno wird z.B. auf der Oberfläche von hämatopoetischen Zellen wie Monozyten, T- und B-Zellen sowie Neuronen und Endothelzellen exponiert und fungiert dort unter anderem als starker Plasminogen Rezeptor (Plow und Das, 2009). Die Menge der oberflächen-assoziierten Expression der Eno variiert und hängt hauptsächlich von den pathophysiologischen Bedingungen der Zellen ab (Miles *et al.*, 1991; Nakajima *et al.*, 1994; Dudani *et al.*, 1993; Redlitz *et al.*, 1995; Fontan *et al.*, 2000). Bedingt durch die Fähigkeit Plasminogen zu binden wird vermutet, dass die Eno eine Funktion in der Geweberegeneration am Herzmuskel hat (Ramos *et al.*, 2012). Die Serinprotease Plasmin vermittelt dort die Degradation der extrazellulären Matrix und die von Narbengewebe nach einer Ischämie. In diesem Zusammenhang wurde die α -Eno auch als früher Marker für akute Herzmuskelentzündungen vorgeschlagen (Mair, 1997). Ihre Fähigkeit Plasminogen zu binden, und dessen Aktivierung zu Plasmin zu beschleunigen spielt eine entscheidende Rolle bei Erneuerungsprozessen der EZM nach einer Herz-Verletzung (Pasumarthi und Field, 2002). Von Bergmann und Mitarbeitern aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte bereits 2001 nachgewiesen werden, dass die oberflächenlokalisierte Eno von *S. pneumoniae* Plasminogen binden und mit wirtseigenen Plasminogen-Aktivatoren zu Plasmin umwandeln kann (Bergmann *et al.*, 2001). Ihr gelang die Identifizierung der Plasminogenbindungsmotive und die Charakterisierung der Pneumokokken-Plasminogeninteraktion als Virulenzmechanismus im Mausmodell (Bergmann *et al.*, 2003). Zudem bestätigen funktionelle Analysen zur Fibrin- und

EZM-Degradation die wichtige Funktion der Plasminogen-Bindung durch die Oberflächen-assoziierte Eno in der Beschleunigung der Plasmin-Proteaseaktivierung (Bergmann *et al.*, 2005; 2007). In Adhärenzstudien konnte weiterhin die Eno-vermittelte Plasminogenrekrutierung an die Oberfläche der Pneumokokken als Adhärenzmechanismus identifiziert werden, der sowohl die Bakterien-Adhärenz als auch dessen Internalisierung in humane Endothel- und Epithelzellen vermittelt (Bergmann *et al.*, 2013). Die Plasminogen Bindungseigenschaft der oberflächen-assoziierten, bakteriellen Eno konnte für einige weitere mikrobielle Gram-positive wie auch Gram-negative Pathogene gezeigt werden. Weitere Beispiele sind *Aeromonas hydrophila* (Sha *et al.*, 2009), *Mycobacterium tuberculosis* (Rahi *et al.*, 2017), *Klebsiella pneumoniae* (Thomas *et al.*, 2013), *Streptococcus pyogenes* (Pancholi und Fischetti, 1998), *Borrelia burgdorferi* (Floden *et al.*, 2011), *Bifidobacterium lactis* (Candela *et al.*, 2009) und *Bacillus anthracis* (Agarwal *et al.*, 2008).

1.1.5. Epidemiologie und Pathogenese von *S. pneumoniae*

S. pneumoniae ist ein Beispiel für ein extrazelluläres Pathogen mit hohem invasivem Potenzial, das weltweit mit am meisten Todesfälle verursacht (Normark und Tuomanen, 2013). Pneumokokken-Infektion werden durch Tröpfcheninfektion und/oder Aerosole von Mensch zu Mensch übertragen. Der Übertragungsweg und die Infektionsrouten sind in Abbildung 1-7 dargestellt. Die Risikogruppen sind vor allem kleine Kinder unter fünf Jahren in Entwicklungsländern und ältere Menschen (Centers for Disease Control, 2008). In Studien aus den USA konnte gezeigt werden, dass Pneumokokken-Infektion in 20% der Fälle zu einer Sepsis führen. Weitere Krankheitsfolgen können Meningitiden sein, die Letalitätsraten von 30% erreichen können (Tomasz, 1997).

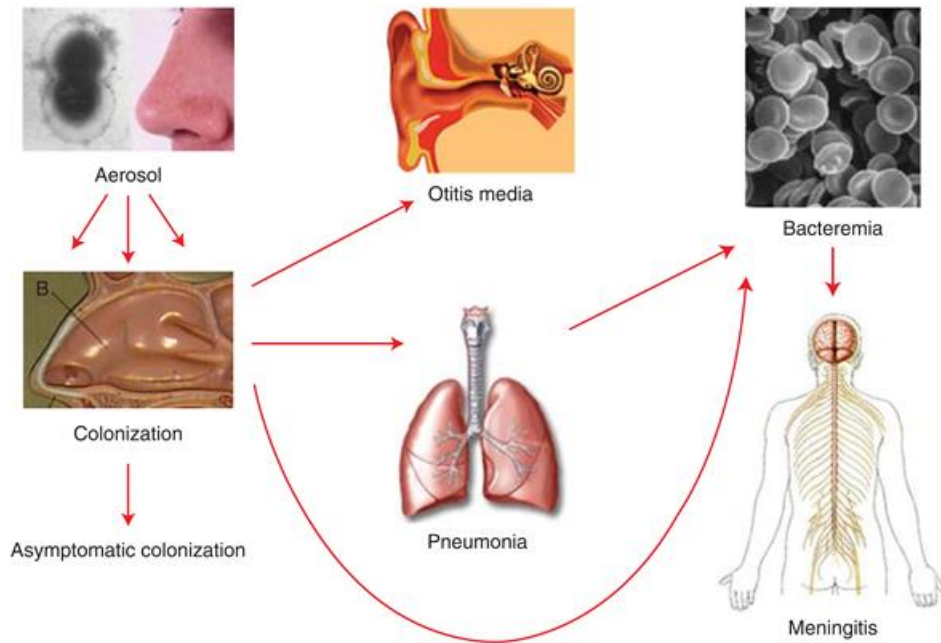


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Ausbreitungswege der Pneumokokken im menschlichen Körper

Pneumokokken besiedeln den Nasenrachenraum und können über Aerosole übertragen werden. Die nasopharyngeale Besiedelung führt meist wieder zu einer Beseitigung der Pneumokokken und einer Serotyp-spezifischen Immunität. In einigen Fällen kann es dennoch nach Erstbesiedlung zu Mittelohrentzündung bei Kindern kommen. Eine invasive Erkrankung durch Pneumokokken ist verbunden mit einer Ausbreitung in die Lunge und den Blutstrom. Aus dem Blutstrom überwinden die Bakterien in selteneren Fällen die Blut-Hirn-Schranke und lösen Meningitiden aus.

Die einzelnen Abschnitte der Infektionsroute beginnen in der Nasenhöhle, in der Pneumokokken an die Epithelzellen im Nasenrachenraum binden und diese kolonisieren können. Die hauptsächliche Kolonisierung erfolgt bei Kindern im Alter von 2-3 Jahren. Vom Jugendlichenalter bis zum Erwachsenenalter nimmt die Zahl der Kolonisierten von 10–50% bei gesunden Kindern (Khan und Pichichero, 2014) auf 10% ab und steigt dann bei älteren Menschen wieder an (Normark und Tuomanen, 2013). Die Dauer einer nachweisbaren Kolonisierung bei Kindern reduziert sich mit steigendem Alter von einer durchschnittlichen Kolonisierungsdauer von 43 Tagen bei jüngeren Kindern, auf 25 Tage bei älteren Kindern (Högberg *et al.*, 2007). Von dort können sie mit dem Sekretfluss in Nasennebenhöhlen und von dort in die Bronchien und über die Eustachische Röhre auch in das Mittelohr gelangen (Bergenfelz und Hakansson, 2017). Dort können sie milde Infektionen wie eine Mittelohrentzündung auslösen, aber auch nach Vordringen in die Lungenlappen schwerwiegende Infektionen wie eine Lobarpneumonie bewirken (Dockrell *et al.*, 2012). Lungenentzündungen sind durch eine Gewebeerstörung charakterisiert, die sowohl von bakteriellen Proteasen und dem Pneumolysin, als auch von Faktoren des Immunsystems

induziert wird (Xu *et al.*, 2008; Dockrell *et al.*, 2012). Dies ermöglicht das Überwinden der Luft-Blut-Schranke und das weitere Vordringen der Pneumokokken durch das mikrovaskuläre Lungenendothel in der Lunge. Für die beschriebenen Pathogeneseverläufe und Krankheitssymptome sind die Virulenzfaktoren der Pneumokokken von entscheidender Bedeutung. Ein wichtiger Virulenzfaktor ist die Polysaccharidkapsel. Einige Serotypen sind hauptsächlich mit Infektionserkrankungen von Kindern assoziiert. Es handelt sich um die Serotypen 6B, 9V, 14, 19F, und 23F. Grundsätzlich wird vermutet, dass die Kapsel-bedingten Serotyp-Prävalenzen in direktem Zusammenhang mit der Ausprägung der Virulenz stehen könnte (Brueggemann und Peto 2004; Sandgren *et al.*, 2004, 2005). Andere Serotypen, wie der Serotyp 1 und 7F, treten häufiger im Zusammenhang mit invasiven Erkrankungen auf (Normark und Tuomanen, 2013). Im Blutstrom ist die Kapsel der Pneumokokken ein wichtiger Schutzfaktor vor Phagozytose durch professionelle Makrophagen. Zudem inhibiert die negative Ladung der Polysaccharidkapsel die Opsonisierung durch Faktoren des Komplementsystems (Briles *et al.*, 1992). Die Dicke bzw. Menge an Kapsel ist ebenso entscheidend für die Virulenz, da unkapselter Stämme avirulent sind (Normark und Tuomanen, 2013). Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die Kapselexpression je nach Wirtsnische variabel ist. In Infektionsstudien im Mausmodell konnten Hammerschmidt und Mitarbeiter nachweisen, dass die Kapseldicke von Pneumokokken bei Kontakt zu Gewebezellen verringert wird. Dadurch werden Adhärenzfaktoren demaskiert, die zur bakteriellen Kolonisierung beitragen (Abbildung 1-8.; Hammerschmidt *et al.*, 2005).

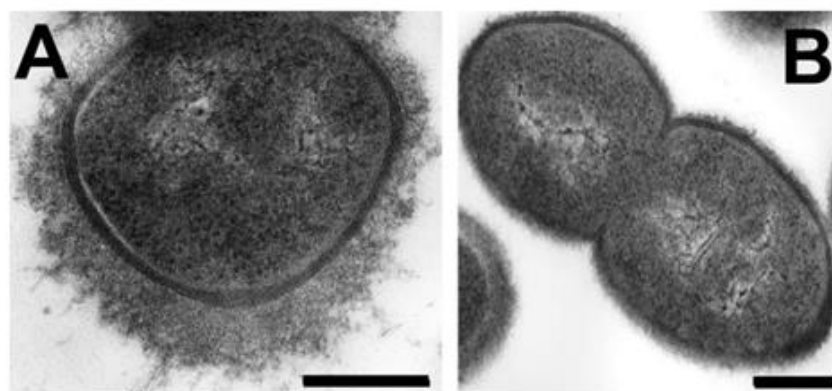


Abbildung 1-8: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Serotyp 1 Pneumokokkus mit unterschiedlicher Kapselexpression

In (A) ist die Kapselexpression des Serotyp 1 Wildtyp-Stamm P53 nach LRR-White Fixierung dargestellt. (B) zeigt den gleichen Stamm nach Isolation aus einer Infektion mit humanen Epithelzellen. Die Kapseldicke ist stark reduziert. Der Masstabsbalken entspricht 0.25 μm , modifiziert nach Hammerschmidt *et al.*, 2005.

Zurzeit tritt der Pneumokokken Serotyp 19F in Deutschland am häufigsten auf, während die Anzahl der durch diesen Serotyp ausgelösten invasiven Erkrankungen sehr gering ist (Sandgren *et al.*, 2004). Aufgrund der vakzinierungsbedingten Verschiebung des in Erkrankungen vorherrschenden Serotyp-Profiles, sind Serotyp-Prävalenzen einer ständigen Variation ausgesetzt. Während des Infektionsverlaufs vermitteln die im oberen Kapitel beschriebenen Adhärenzfaktoren eine Anheftung an die Alveolarepithelien und fördern zudem die Ausbreitung der Bakterien bis in das vaskuläre System und in die Meningen. Die Fähigkeit zur Bildung eines Biofilmes im Nasenrachenraum zählt zu den wichtigen Pathogenesemechanismen der Pneumokokken und ermöglicht eine erfolgreiche und längere Kolonisierung. Die Biofilmbildung wird durch das Pneumococcal serin-rich repeat protein (PsrP) gefördert, das zur bakteriellen Aggregatbildung auch zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies vermittelt (Sanchez *et al.*, 2010). Die Epidemiologie der Pneumokokken steht in engem Zusammenhang mit einer vorherigen viralen Infektion. So erhöht eine Influenza-Virusinfektion die Mortalitätsrate einer anschließenden Sekundärinfektion durch Pneumokokken (Crotty, *et al.*, 2015). Die Ko-Kolonisierung von Influenza-Viren mit Pneumokokken führt zu einer synergistischen Typ-1 Interferon-stimulierten Immunantwort, die letztlich zu einer Schwächung der Pneumokokken-spezifischen Immunabwehr führt. (Nakamura *et al.*, 2011). Die um 1918/19 als spanische Grippe in den Weltchroniken vermerkte Pandemie forderte hohen Opferzahlen in Millionenhöhe aufgrund der Folge von bakteriellen Sekundärinfektionen (Walthers *et al.*, 2016). Die Interaktion der von den Pneumokokken sekretierten Komponente und deren Oberflächen exprimierten Virulenz- und Adhäsions-Faktoren mit den Epithelzellen und Komponenten der angeborenen Immunabwehr wie Makrophagen und Mastzellen moduliert den Krankheitsverlauf. Das porenformende Toxin Peumolysin und die bakterielle Freisetzung von H_2O_2 führen zur massiven Zerstörung des Lungengewebes und fördert die Freisetzung von Lungenflüssigkeit, in der auch VWF enthalten ist (Canvin *et al.*, 1995; Ware *et al.*, 2001).

Dies ermöglicht neben dem ersten Kontakt mit VWF, die tiefere Migration der Pneumokokken und das Eintreten durch das Lungenendothel in die Blutbahn. Während dieser Phase der Immunantwort ist eine erhöhte Adhäsion der Pneumokokken an das alveolare Epithel beschrieben durch Adhäsine wie z.B. Lipoproteine, Cholin-bindene Proteine und Proteine, die mit der EZM interagieren wie PavB und PclA (Jensch *et al.*, 2010; Löfling *et al.*, 2011). Viele respiratorische Pathogene nutzen ähnliche Strategien zur Auslösung einer Erkrankung über die

Schleimhäute sowie für die nachfolgende Migration in tiefere Gewebeschichten bis hin zur Bakteriämie im Blutstrom. Dieser Prozess wird als „angeborene Invasion“ (in Englisch: innate invasion) bezeichnet und befindet sich in Wechselwirkung mit der angeborenen Immunität (Gould und Weiser, 2002; Thornton *et al.*, 2010). Der Schlüsselrezeptor die „angeborene Invasion“ ist dabei der platelet-activating factor receptor (PAFr), der unter anderem auf der Oberfläche von Immunzellen und Endothezellen vorkommt (Cundell *et al.*, 1995).

1.2. Der humane Von Willebrand Faktor und seine Bedeutung in der Pathogenese

1.2.1. Vorkommen und Funktion des Von Willebrand Faktor

Das Glykoprotein Von Willebrand Faktor (VWF) ist das zentrale Protein der Hämostase. Bei der Hämostase (Blutstillung) handelt es sich um einen lebenswichtigen Mechanismus, der durch Bildung von Fibrinthromben eine unkontrollierte Blutung verhindert. Der schematische Querschnitt durch arterielle und venöse Blutgefäße ist in Abbildung 1-9 dargestellt.

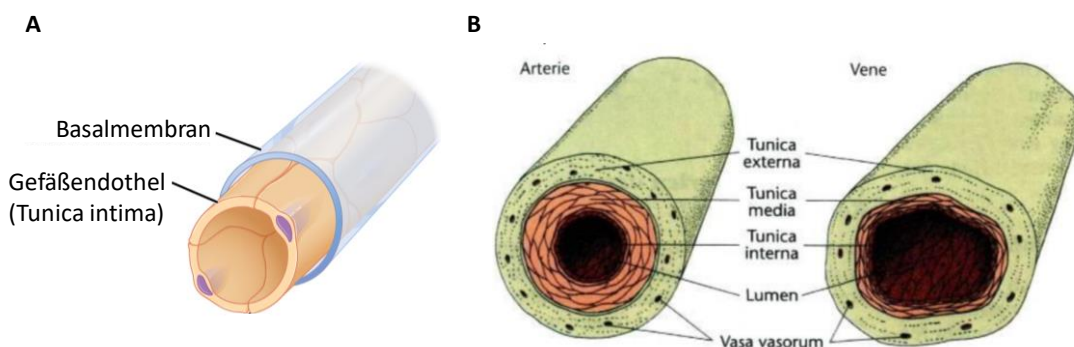


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung des Querschnitts durch ein arterielles und ein venöses Blutgefäß
 In (A) ist der vereinfachte Aufbau bestehend aus dem Gefäßendothel, der Tunica intima, und die sich anschließende Basalmembran im Querschnitt dargestellt. Im Anschluss an die Endothelschicht bildet die Basalmembran eine Barriere zum Subendothel. In (B) ist der schematische Querschnitt durch ein arterielles und ein venöses Blutgefäß dargestellt. Dabei liegen Unterschiede in der Größe des Lumen und der Schichtdicke der Tunica media vor. Die Arterien weisen im direkten Vergleich ein kleineres Lumen und eine dickere Tunica media auf. (A) modifiziert nach Huppelsberg, J. & Walter, K. (vierte Auflage); Kurzlehrbuch Physiologie; Thieme. (B) aus Schäffler /Schmidt; Lehrbuch und Atlas des menschlichen Körpers (2002).

Die innerste Schicht ist dabei die Tunica intima/interna (Abbildung 1-9 A + B). Sie ist bei arteriellen und venösen Blutgefäßen gleich aufgebaut und setzt sich aus einer Lage/Schicht von in Längsachse zum Gefäß ausgereichten Gefäßendothelzellen zusammen, die für den Gas- und Stoffaustausch mit dem Blut und dem sich anschließendem Gewebe verantwortlich ist. Darauf

folgt die Basalmembran und Subendothelschicht. Diese grenzen die Tunica intima von der drauffolgenden Tunica media und dem Bindegewebe, welches sich unter anderem aus Kollagen zusammensetzt, ab (Schäffler/Schmidt; Lehrbuch und Atlas des menschlichen Körpers (2002)).

Zu Beginn der Hämostase erfolgt im Gefäß über multimerisierten VWF-Fäden die Rekrutierung der Thrombozyten und ihre Verankerung mit Kollagenen in der subendothelialen EZM. Die Domänenstruktur des VWF ist in Abbildung 1-10A dargestellt.

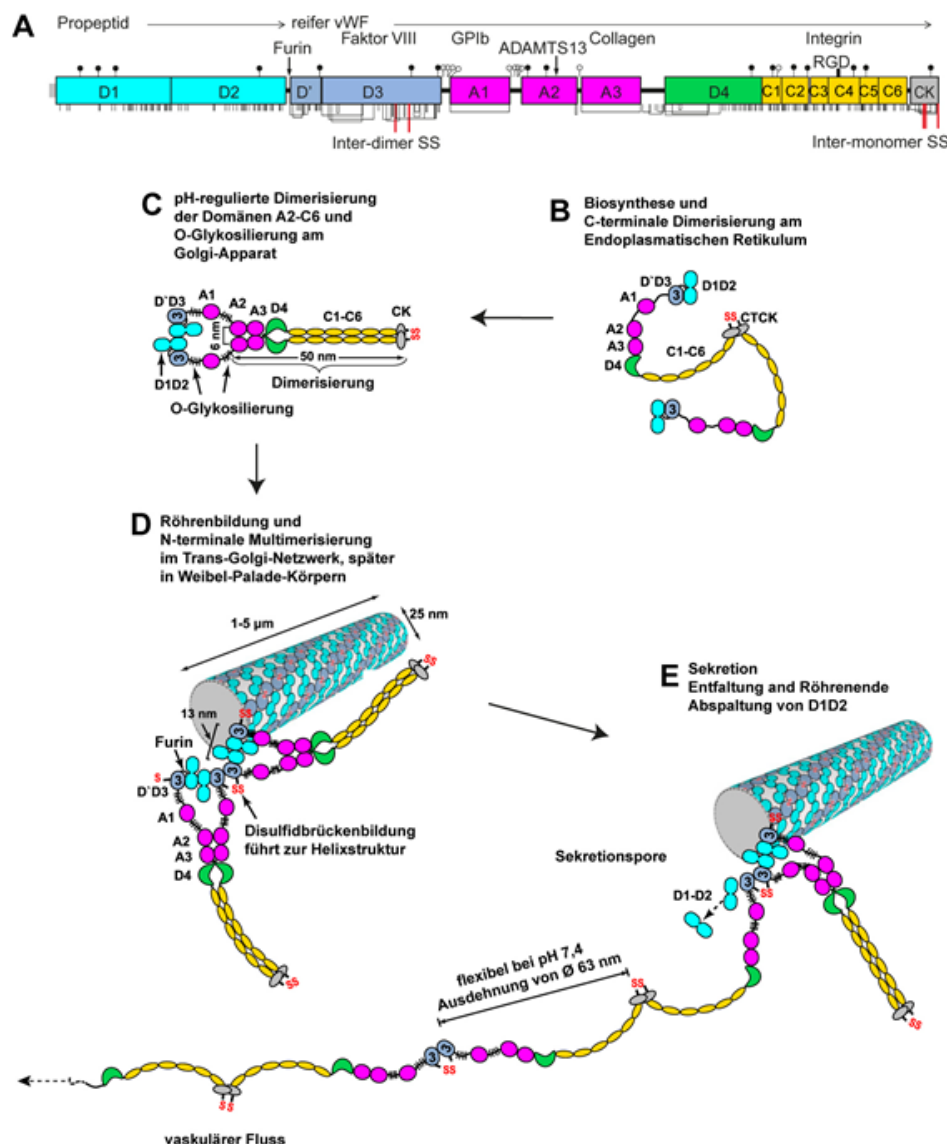


Abbildung 1-10: Molekülstruktur des Von Willebrand Faktors

(A) Domänen des vWF: Propeptid bestehend aus Domänen D1 und D2; gereifter VWF bestehend aus den Domänen D'D3 bis CK. (B) Nach der Biosynthese findet eine C-terminale Dimerisierung statt. (C) Verbindung des Dimers über die gesamte Länge. (D) Röhrenbildung und Multimerisierung durch Disulfidbrückenbildung zwischen den D3 Domänen verschiedener Dimere. (E) VWF Sekretion durch Entfaltung der Röhre und Abspaltung des Propeptids. Abbildung abgewandelt aus Springer, 2011 und Springer, 2014.

Das VWF Molekül exponiert zur Thrombozytenbindung im scherstressabhängigen elongierten Zustand die A1-Domäne zur Anheftung von Thrombozyten über das Glykoprotein GPIb α . Die Aktivierung der Thrombozyten durch P-Selektin aus den WPB führt zu einer vermehrten Exposition des Glykoproteinrezeptors GbIIb-IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) und bewirkt eine Vernetzung der Thrombozyten untereinander (Phillips *et al.*, 1991). Die Kollagenbindungsstellen des VWF befinden sich in der A1 und in der A3-Domäne (Springer, 2014). Daneben befinden sich in der D'- und in der A1-Domäne auch Bindungsstellen für Heparin. Zudem dient VWF als Trägermolekül für den in der D'-Domäne gebundenen Gerinnungsfaktor VIII, der durch die Initiierung der Fibrineinlagerung maßgeblich zur Stabilisierung der Thromben beiträgt (Ruggeri, 1997 und Mannucci, 1998). Der aktivierte Faktor VIIIa löst sich vom VWF, um als Katalysator in der Aktivierungskaskade der sekundären Hämostase zu wirken (Dahlbäck, 2000). Daher erfüllt der VWF auch indirekt eine elementare Funktion in der eigentlichen Blutgerinnung. Ebenso bindet der VWF über seine A1- und A3-Domänen an Kollagen in der subendothelialen Matrix (Springer, 2014). Die Bezeichnung „VWF“ ist auf den finnischen Arzt Erich von Willebrand zurückzuführen, der das Protein erstmals im Zusammenhang mit der im Volksmund als „Bluterkrankheit“ bezeichneten Hämophilien ausführlich studierte (Willebrand, 1999 und Lenting *et al.*, 2012). Die Hämophilien basieren auf einer erhöhten Blutungsneigung und werden je nach Ursache in verschiedene Typen unterteilt. Neben dem mit 85% häufigsten Hämophilie-Typen A, ist der seltenere Typ B mit einem Mangel an Gerinnungsfaktor IX assoziiert. Hämophilien des Typs A werden entweder durch einen Mangel an VWF bzw. an Faktor VIII im Blut oder durch einen Funktionsverlust des VWF verursacht, der vor allem durch Mutation(en) in der A2-Domäne gekennzeichnet ist (Gresele und Momi, 2012). Molekularbiologische Betrachtungen der Typ2A Hämophilie ergaben beispielsweise, dass verschiedene Mutationen sowohl die Biosynthese des VWF, als auch seine Funktion beeinträchtigen und unterschiedliche Schweregrade der Blutungsneigung induzieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass Typ2A-Mutationen sich Scherkraft abhängig aber auch unabhängig auswirken können (Brehm *et al.*, 2014). Das auch als Pseudohämophilie bezeichnete Willebrand-Jürgens-Syndrom tritt vor allem postoperativ oder bei Schwangeren auf. Bei gesunden Menschen beträgt die Plasmakonzentration des VWF etwa 10 $\mu\text{g/mL}$ (Mannucci, 1998).

1.1.4 Aufbau und strukturelles Verhalten des vWF

VWF wird von Endothelzellen und Megakaryozyten produziert und zusammen mit anderen für die Homöostase wichtigen Faktoren wie vasokonstriktives Endothelin, P-Selectin und Zytokinen in endothelialen Vesikeln, den Weibel-Palade-Bodies WPB gespeichert (Michaux und Cutler, 2004; Metcalf *et al.*, 2008; Romani de Wit *et al.*, 2003; Goligorsky *et al.*, 2009). Nach der Translation des VWF-Proteins an Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums lagern sich die VWF-Monomere zunächst über ihren C-terminalen Cysteinknoten (CK) zu Dimeren zusammen. In Abbildung 1-10 A - E sind die Domänenstruktur des VWF und einzelne Syntheseschritte schematisch (modifiziert aus Springer, 2011; 2014). Im Anschluss an die initiale Dimerisierung erfolgt am Golgi-Apparat eine pH-regulierte Zusammenlagerung der VWF-Untereinheiten über die gesamte Länge des Dimers (Abbildung 1-10 C). Die Domänen D1 und D2 des Propeptids lagern sich ebenfalls zusammen und es finden O-Glykosilierungen an beiden Termini der A1-Domäne statt. Während des Transportes durch das Trans-Golgi-Netzwerk lagern sich die Untereinheiten röhrenförmig zusammen. Hierbei bilden die D3-Domänen von zwei jeweils benachbarten Dimeren untereinander Disulfidbrücken aus (Abbildung 1-10 D). Diese röhrenförmigen VWF-Proteinkomplexe bilden den Hauptbestandteil der WPB (Metcalf *et al.*, 2008) und sind auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen als zigarrenförmige Proteinstrukturen zu erkennen (Abbildung 1-11 A+B).

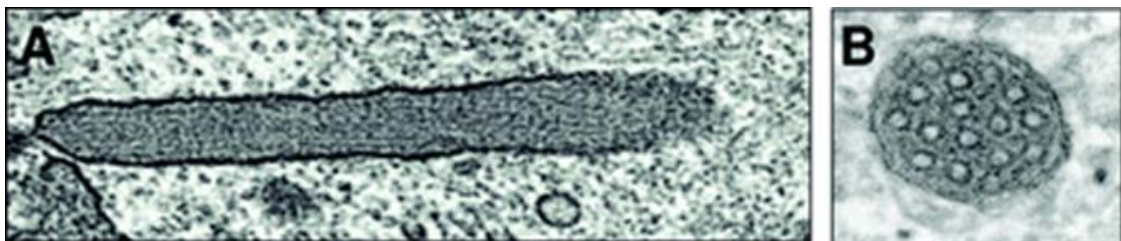


Abbildung 1-11: Elektronenmikroskopische Darstellung von WPB

(A) seitliche Aufnahme eines WPB. (B) Querschnitt eines WPB mit röhrenförmigen VWF-Fasern. (Aus: Rondaij *et al.*, 2006).

Durch einen Verletzungs- oder Entzündungs-vermittelten Stimulus erfolgen die unmittelbare Exozytose der WPB und damit die Sekretion des VWF aus den Endothelzellen der Gefäßwand in die Blutbahn. Hierbei werden die röhrenförmigen VWF-Komplexe abgerollt und das Propeptid D1-D2 abgespalten (Abbildung 1-10 E). Durch die Scherkräfte des Blutstroms

werden die VWF-Multimere auseinandergezogen und bilden lange VWF-Fäden aus (Springer, 2011; 2014).

Ein wichtiges Zytokin aus den WPB ist Interleukin-8, welches als Entzündungsmediator fungiert. Ebenso sind neben den schon genannten Endothelinen, die den Blutdruck regulieren, P-Selektin und CD63 zu nennen. P-Selektin ist dabei wichtig bei der Aktivierung von Thrombozyten und CD63 wirkt Apoptose entgegen und dient auch der Thrombozyten Aktivierung (Metcalf *et al.*, 2008). Im Plasma bestehen die elongierten VWF-Multimere unter Scherstress aus 40-200 Monomeren mit einer Länge bis 15 µm (Schneide *et al.*, 2006; Springer, 2011). Die prokoagulative Aktivität des VWF wird durch eine spezifische Spaltung durch das Enzym ADAMTS13 (*a desintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin 1-like-domain 13*) präzise reguliert, um Gefäßschädigungen durch Thrombosen zu verhindern (Dong *et al.*, 2002; Tersteeg *et al.*, 2014; Moake *et al.*, 1986 und Levy *et al.*, 2001). Die Spaltstelle für ADAMTS-13 befindet sich in der A2-Domäne und ist nur bei Scherstress-elongierten VWF-Komplexen zugänglich (Dong *et al.*, 2002, Crawley *et al.*, 2011). Die Spaltungsrate des VWF korreliert direkt mit dem Grad der Scherung des Moleküls (Auton *et al.*, 2007 und Wu *et al.*, 2010).

1.2.2. Interaktionen des VWF im Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen

VWF übernimmt elementare Funktionen in der Hämostase, die durch eine Einkapselung von Pathogenen auch zur Abwehr von invasiven mikrobiellen Infektionen beiträgt. Bislang sind jedoch nur wenige Studien zur direkten Funktion des VWF im Verlauf der mikrobiellen Pathogenese bekannt. In diesem Zusammenhang wurden weltweit nur drei bakterielle VWF-Bindungsproteine identifiziert. Es handelt sich um das LPxTG-verankerte Oberflächenprotein A (SpA) (Hartleib *et al.*, 2000) und das Protein vWBP (Bjerketorp *et al.*, 2002) von *S. aureus*, sowie das vWBL von *S. lugdunensis*, das von Nilsson und Mitarbeitern beschrieben wurde (Nilsson *et al.*, 2004).

Bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* konnte gezeigt werden, dass von diesem Bakterium sogar VWF im Scherstress gebunden werden kann und zu einer verstärkten Ausbreitung im kardiovaskulären System genutzt werden kann (Pappelbaum *et al.*, 2013). *S. aureus* exprimiert zwei VWF-bindende Proteine: Das über LPxTG-verankerte Oberflächenprotein A (SpA), sowie das sekretierte VWF-Bindungsprotein vWbp (Hartleib *et al.*, 2000; Bjerketorp *et al.*, 2002). vWbp ist dabei assoziiert mit Zellwand und wird sekretiert (Claes *et al.*, 2017). *S. aureus* bindet über einen Proteinkomplex aus dem

oberflächengebundenen ClfA und dem vWbp an VWF und kann so an die Gefäßwand adhären (Claes *et al.*, 2017). Im Gegensatz zu SpA bindet vWbp bevorzugt an elongierten VWF unter hohen Scherkräften von 10 dyn/cm² (Claes *et al.*, 2017). Ein zusätzliches bekanntes VWF-Bindungsprotein mit der Bezeichnung vWbl, ist aus *Staphylococcus lugdunensis* bekannt (Nilsson *et al.*, 2004). Durch Lüttge *et al.*, 2012 ist bekannt, dass Pneumokokken die Sekretion von VWF und damit auch die Sekretion von VWF aus Endothelzellen induzieren können. Dieser Effekt wird durch die Bindung von vitalen Pneumokokken an der Endothelzelloberfläche, sowie durch die zytotoxische Aktivität des Pneumolysins ausgelöst (Lüttge *et al.*, 2012). Im Weiteren soll die Pneumokokken Eno als mögliches VWF-Bindungsprotein untersucht werden.

1.3. Die Flusskultivierung von Endothel für die Pneumokokken-Infektion

Die Flusskultivierung von humanen Zellen ermöglicht eine definierte Simulation der Scherkräfte im Blutstrom und Mikroskopie-basierte Untersuchungen zur Gewebekonstruktion und Differenzierung in Echtzeit. Daneben wird die Mikrofluidik für wissenschaftliche Fragestellungen im Bereich der Diagnostik, der Immunologie, der Krebs- und Stammzellforschung und der Angiogenese eingesetzt (Tehranirokh M *et al.*, 2013). Ebenso lassen sich mit dieser Kultivierungsmethode die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und EZM-Protein-Interaktionen untersuchen, sowie die Auswirkung von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Hormonen auf die Zellfunktionen (Tehranirokh M *et al.*, 2013; Bergmann und Steinert, 2013). Ein weiterer Vorteil der Flusskultivierung von Zellen liegt in der Möglichkeit, Langzeit-Untersuchungen von Zell-Populationen in einem definierten Scherstress vorzunehmen zu können zur Analyse von kardiovaskulären Erkrankungen (Mannino *et al.*, 2018).

In der vorliegenden Arbeit wird ein Mikrofluidiksystem etabliert, da es sich bei dem im Fokus stehenden VWF-Protein um ein mechanosensitives Protein handelt, das im Scherstress seine Konformation und seine funktionellen Aktivitäten ändert (Springer, 2014). Die Anwendung eines Mikrofluidiksystems mit humanen Endothelzellen schafft geeignete Zellkulturbedingungen zur Analyse, ob und wie eine Interaktion zwischen elongiertem VWF und Pneumokokken im Blutstrom des Menschen stattfindet. Zurzeit werden zwei verschiedenen technische Grundkonzepte der Mikrofluidik in der wissenschaftlichen Forschung eingesetzt. Das Pumpensystem des sogenannten „*Harvard-Apparatus*“ ermöglicht das einmalige Pumpen

von Flüssigkeiten in definiertem Volumen durch einen speziellen Perfusionsaufbau (Abbildung 1-12 A). Das Mikrofluidik-System der Firma ibidi® nutzt ein Pumpensystem mit einer speziellen Ventilanordnung, so dass die Flüssigkeit aus zwei Reservoirs unter definierten Strömungsbedingungen kontinuierlich zirkulieren kann (Abbildung 1-12 B; David und Hartung, 2017).

A



B



Abbildung 1-12: Der Harvard-Apparatus und Das ibidi®-Mikrofluidik-System

In (A) ist der *Harvard-Apparatus* als Mikrofluidik-System dargestellt mit zwei Perfusions-Spritzen, die das Flusssystem bilden. Abbildung modifiziert aus Moore *et al.*, 2018. In (B) ist das ibidi®-Mikrofluidik-System dargestellt. Von links nach rechts zu sehen ist die luftgesteuerte Pumpe, der benötigte PC für die Steuerungs-Software der Pumpe (*PumpControl*) und die Mikrofluidik-Einheit mit ihren zwei Reservoirs und dem eingesetzten Luer-slide. Die Pumpe generiert dabei den benötigten Luftdruck und übt diesen durch die Reservoir-Filter auf die Flüssigkeit in den Reservoirs aus. Das Ventil in der Mitte der Mikrofluidik-Einheit ermöglicht einen unidirektionalen Fluss durch das Luer-slide.

Dieses System wurde zur Bearbeitung der Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit etabliert, da es die Langzeitkultivierung von Endothelzellen unter sterilen Bedingungen ermöglicht und die Differenzierung der primären Endothelzellen begünstigt.

1.4. Die Zebrafischlarven als *in vivo* Modell für kardiovaskuläre Erkrankungen im Menschen

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) ist ein tropischer Fisch, der als anerkanntes Modellsystem zu Untersuchungen von verschiedenen entwicklungsbiologischen Vorgängen wie der Embryogenese und von Erkrankungen des Menschen eingesetzt wird (Santoriello und Zon, 2012). Dieses Modell weist mehrere Vorteile gegenüber dem Einsatz anderer Tiermodelle wie

der Maus auf. Ein Vorteil liegt in der großen Zahl an Nachkommen, die mit 200-300 Larven innerhalb einer Woche zeiteffiziente und statistisch bewertbare Analysen ermöglicht. Zudem sind die Larven bis zum Tag 7 nach der Befruchtung (dpf für *days post fertilization*) nur wenige Millimeter groß und transparent, so dass die mikroskopische Visualisierung deutlich erleichtert wird. Besonders hervorzuheben ist der hohe genetische Homologie-Grad von 70 % zwischen *D. rerio* und dem Menschen (Howe *et al.*, 2013). Zebrafische verfügen über die meisten der auch an der humanen Hämostase beteiligten Faktoren, wie z.B. VWF und Fibrinogen. Diese sind sowohl funktionell, als auch strukturell hoch-konserviert (Hanumanthaiah und Jagadeeswaran, 2002). Das *D. rerio* Genlokus für den VWF weist die gleiche Anzahl an 52 Exons auf, wie der menschliche *vwf*-Genlokus. Die Transkripte unterscheiden sich lediglich in der Größe. Während der Zebrafisch-Lokus 81 kB umfasst, umfasst der des Menschen 176 kB (Dang *et al.*, 2011 und Ghosh *et al.*, 2015). Die Ergebnisse der cDNA-Analysen belegen, dass der grundsätzliche funktionelle Aufbau des VWF übereinstimmt und das Pro-Peptid, die ADAMTS 13-Schnittstelle und andere VWF-Domänen konserviert sind (Ghosh *et al.*, 2012). Insgesamt besteht eine 46 % Homologie zwischen dem Zebrafisch VWF und dem humanen VWF. Ergänzend dazu bilden Zebrafische sogenannte pseudo-WBP, die VWF enthalten und den menschlichen WBP sowohl in Größe, als auch in Funktion stark ähneln (Ghosh *et al.*, 2012). Ein schematischer Vergleich der Domänen des Zebrafisch-VWF mit denen des humanen VWF zeigt deutlich, dass die gesamte Domänenanordnung in beiden Spezies identisch ist und verdeutlicht zudem die hohe Konserviertheit der für die VWF-Funktionen wichtigen Domänen (Abbildung 1-13).

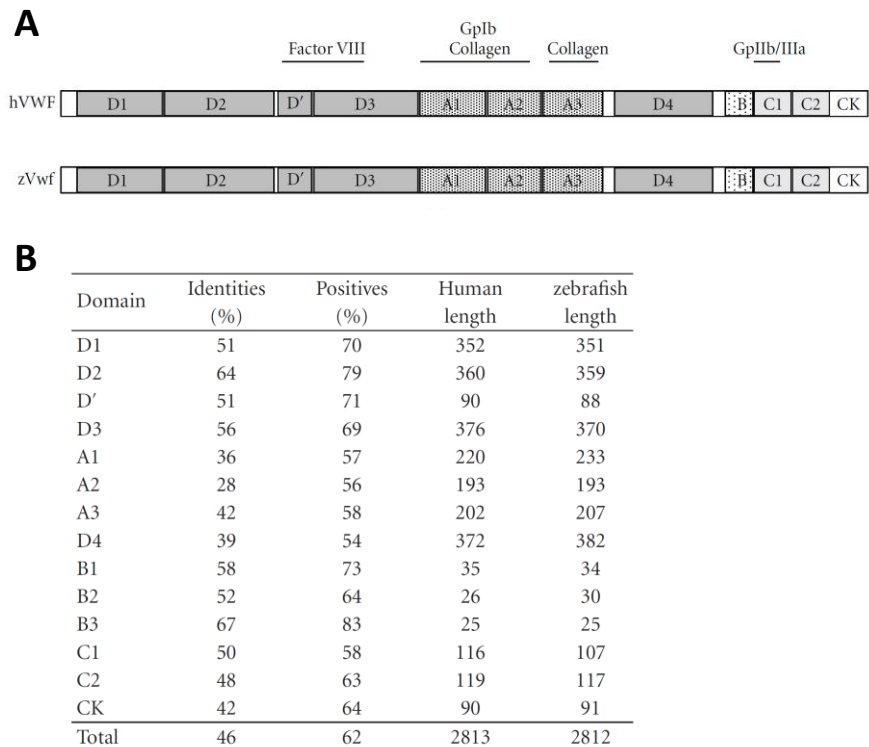


Abbildung 1-13: Vergleich der sequenzbasierten Domänen-Homologien zwischen Zebrafisch VWF und humanem VWF

In (A) sind die Anordnungen der Domänen des humanen VWF (hVWF) dem des Zebrafisch VWF (zVwf) gegenübergestellt. In (B) sind die in (A) dargestellten Domänen aufgeführt und ihre Homologie untereinander. Die prozentuale Identität bezieht sich auf die aufgefundenen identischen Aminosäuren. „Positives“ bezieht sich auf die vorgefundenen identischen Aminosäurenaustausche. „Length“ stellt die Länge der Aminosäuresequenz dar. Die Abbildung wurde modifiziert nach Ghosh *et al.*, 2012.

Die A-Domänen weisen ähnliche Peptidsequenzen auf, wenngleich die prozentuale Sequenzidentität der A2-Domäne bei 28 % und bei der A3-Domäne bei 42 % liegt. In den vergangenen Jahren hat sich der Zebrafisch auch als Infektionsmodell für verschiedene Streptokokken-Arten bewährt und durchgesetzt (Saralahti und Rämetsä, 2015). In Hinblick auf *in vivo*-Analysen der Pathogenese von *S. pneumoniae* wurde z.B. ein Meningitismodell erfolgreich etabliert (Jim *et al.*, 2016). Basierend auf allen den zuvor genannten Vorteilen und Homologien wurde das Zebrafisch-Modell als geeignetes *in vivo* System in enger Kooperation mit Prof. Köster, TU Braunschweig zur Analyse der VWF-vermittelten Pneumokokken-Ädhäsion im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

2 Ziele dieser Arbeit

Infektionserkrankungen durch *S. pneumoniae* führen noch immer zu systemischen Erkrankungen, die aufgrund steigender Resistenzausprägung und eines nur partiellen Impfschutzes für Risikogruppen noch immer eine Lebensbedrohung darstellen (Ampofo *et al.*, 2012; Normark und Tuomanen, 2013; WHO, 2016). Die Aufklärung der Erreger-Wirt-Interaktionen sowie die Charakterisierung der an der Pathogenese beteiligten Faktoren sind daher essenziell wichtig, um neue Ansatzpunkte für Therapie- und Präventionsmaßnahmen zu finden. Im Infektionsverlauf gelangen Pneumokokken in den Blutstrom des Menschen, adhären an das Endothel der Gefäßwände und stimulieren die Sekretion des VWF (Lüttge *et al.*, 2012). Dieses Glykoprotein zirkuliert als globuläres Protein im Blut und multimerisiert zu langen VWF-Fäden bei Scherkräfteinwirkung. In dieser mechanoresponsiven, elongierten Konformation übernimmt der VWF essenzielle Funktionen in der Thrombenbildung im Verlauf der Hämostase (Springer, 2014).

Die Zielstellung dieser Arbeit umfasst drei Hauptaspekte: Zum einen sollte untersucht werden, ob Pneumokokken direkt mit VWF interagieren und ob es Präferenzen für die Bindung verschiedener VWF-Konformation gibt. Zum anderen sollten VWF-Bindungsproteine der Pneumokokken identifiziert werden und die Bindungsstellen sowie die Bindungskinetik näher charakterisiert werden. Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Aufklärung der Funktion der VWF-Bindung in der Pathogenese der Bakterien. In Infektionsanalysen sollte überprüft werden, ob eine Interaktion mit VWF einen Einfluss auf die Adhärenz der Pneumokokken an Gefäß-Endothelzellen hat. Zudem sollte ein Mikrofluidik-System etabliert werden, um in den Zellkulturinfektionsanalysen auch die Scherstress-bedingte Konformationsänderung des VWF im Blutstrom simulieren zu können. Ein hoher Prozentsatz der Patienten, die an schweren Pneumokokken-bedingten Lungenentzündungen leiden, entwickeln in einem Zeitraum von bis zu 10 Jahren nach der Infektion lebensbedrohliche kardiovaskuläre Komplikationen (Restrepo und Reyes, 2018). Es wird vermutet, dass die im Zuge der Infektionen auftretenden Dysbalancen im Hämostase-System in direktem Zusammenhang zu diesen Langzeitfolgen stehen (Rae *et al.*, 2016). Um die Auswirkung der Pneumokokken-VWF-Interaktion für die Hämostase und die Integrität des Gefäßsystems auch in einem komplexen und aktiven Blutsystem aufklären zu können, sind Analysen unter *in vivo*-Bedingungen erforderlich. Das dritte Ziel der Arbeit umfasst daher die Etablierung eines Zebrafisch *in vivo*-Modells zur Detektion von pathophysiologischen Konsequenzen der Interaktion zwischen Pneumokokken und VWF.

3 Materialien und Methoden

3.1. Materialien und Geräte

3.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3-1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Material	Bezeichnung	Hersteller
24-Well-Platten	Multiwell 24 Well	Becton Dickinson GmbH
Absaugpumpen	Vacusafe comfort	IBS Integra Biosciences
	Mini-Membran-Vakuumpumpe	A. Hartenstein
Analysenwaage	TE 214S	Sartorius
Autoklav	LVSA 50/70	Zirbus Technology
CO ₂ Inkubator	MCO-18 AIC	Sanyo
Deckgläschen rund	Durchmesser 12 mm	Thermo Fisher Scientific
Dialyse-Kassetten	Slide-A-Lyser Dialysis Kassetten	Thermo
Druckerzeuger für Injektion	FemtoJet 4i device	Eppendorf
Elektroblotgerät	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad
Elektrophoresekammer (DNA)	Minihorizontal	G&P Kunststofftechnik
Elektrophoresekammer (SDS)	Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad
Filterpapier	Blotting Paper Sheets	Munktell & Filtrak GmbH
Gefrierschrank -80 °C	MDF U73V	Sanyo
Geldokumentationsanlage	DeVision G	DC Science Tec
Glaskapillaren	30-0019 Capillaries	Harvard Apparatus
Heizbad	1002	GFL
Heizblöcke	Thermomixer comfort	Eppendorf
	Thriller	Peqlab
Hybridisierungsöfen		
Inverse Stereolupe	KL 200LED	Leica
Kolbenhubpipetten	Transferpette S	Brand GmbH&Co KG
	Pipetman classic	Gilson

	pipet lite	Rainin
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	TCS SP8	Leica
Küvetten	Küvetten	Sarstedt
Lichtmikroskop	Axiovert 35 M	Zeiss
Luer-slides	0.4 Luer Slides (ibidi®)	ibidi
Magnetrührer	REO basic C	IKA
	RH basic 2	IKA
μ-Petrischale	μ-Dish 35 mm, hoher Rand	Ibidi
Mikrofluidik-Einheit	Fluidik Einheit und Pumpe	ibidi
Mikrozentrifugen	Centrifuge 5424	Eppendorf
	Mini Spin	Eppendorf
	Z 216 MK	HermLe
	2-16KL	Sigma
MST-Gerät	Monolith NT.115 Series	NanoTemper Technologies GmbH
MST-Kapillaren	Standardkapillaren	NanoTemper Technologies GmbH
Netzgerät (DNA-Elektrophorese)	EV222	Peqlab
Netzgerät (SDS-Elektrophorese)	PowerPac Basic	Bio-Rad
Neubauer Zählkammer	Neubauer Improved	Karl Hecht GmbH&Co KG
Nitrocellulose Membran	Protran BA 83 0,2 μm	Whatman GmbH
Objektträger	Polysine slides	Thermo Fisher Scientific
PCR-Inkubatoren	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad
	peqSTAR 96 Universal Gradient	Peqlab
PCR-Reaktionsgefäß	Multiply-Pro Gefäß 0,2mL	Sarstedt
pH-Meter	Lab 850	Schott
Pipettenspitzen	Pipettenspitze 20 μL/200 μL/1000 μL	Sarstedt
Pipettierhilfen	PipetHelp	Accumax
	accu-jet pro	Brand GmbH&Co KG
Pipettenzieher	DKI Model 700c	David Kopf Instruments

Plastik Injektionsspitzen	Eppendorf microloader	Eppendorf
Präzisionswaage	TE 3201S	Sartorius
Reaktionsgefäße 1,5 mL/ 2 mL	Reagiergefäß 1,5 mL/ 2 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäß 50 mL	Röhre 50 mL	Sarstedt
Reinstwassererzeugung	Milli-Q Advantage A10	Millipore
Perfusion Set	gelb/grünes Perfusionsset ID 1.6 mm	ibidi
Rollinkubator	Taumelrollenmischer RM5	Labortechnik Froebel
Schüttelinkubator	WT12	Biometra
Serologische Pipetten	Serologische Pipette	Sarstedt
Sicherheitswerkbänke	Hera Safe KS 12	Thermo Fisher Scientific
	Hera Safe KS 18	Thermo Fisher Scientific
Spektralphotometer	Libra S22	Biochrom
	NanoDrop	Thermo Fisher Scientific
Verschlussfolie	Parafilm M	Brand GmbH&Co KG
Zellkulturflaschen 75cm ²	Zellkulturflasche 75 Filter	TPP
Zentrifugen	Allegra X-12R	Beckman Coulter
	Allegra X-30	Beckman Coulter
	2-16KL	Sigma

3.1.2. Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 3-2: Informationen zu verwendeten Bakterienstämmen

Bakterium und Bezeichnung	Serotyp/ Vektor	Resistenz	Besonderheit	Herkunft
<i>S. pneumoniae</i> ; SP19	37A/47	-	Wildtyp	Hammerschmidt, Greifswald

<i>S. pneumoniae</i> ; PM01 Δply	37A/47	Erythromycin	Sp19, Pneumolysin- defizient	Hammerschmidt, Greifswald
<i>S. pneumoniae</i> ; PM09 Δcps	2	Kanamycin	D39, Kapsel- deficient	Hammerschmidt, Greifswald
<i>S. Pneumonia</i> ; PM40; Sp19hlpA- tagRFP-cat	37A/47	Chloramphenicol	Sp 19, Rot Fluoreszierend	IKBehrens 08/2015
<i>S. pneumoniae</i> ; PM43; D39hlpA- RFPcat	2	Chloramphenicol	Rot Fluoreszierend	Bezogen aus Greifswald, konstruiert in Groningen 10/2016
<i>S. pneumoniae</i> ; PM 46; 37A/47hlpA- RFPcat	37A/47	Erythromycin/ Chloramphenicol	Rot Fluoreszierend	VELSPAß 06/2017
<i>S. pneumoniae</i> ; PM 47; 2hlpA-RFPcat	2	Kanamycin/ Chloramphenicol	Rot Fluoreszierend	VELSPAß 06/2017

<i>E. coli</i> ; K12 (ATCC 47076)	-	-	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig
<i>E. coli</i> ; M15; DZ291	pQE30	Kanamycin, Ampicillin	Wildtyp mit Expressionsvektor	S. Bergmann

Tabelle 3-3: Information zu verwendeten Zelllinien und Zebrafisch-Stämme

Zelllinie/ Stämme	Bezeichnung	Herkunft
Makrophagenzelllinie THP-1	Humane leukemische Monozyten, Lymphomzelllinie	ACC16; DSMZ
Endothelzellen der Nabelschnurvene HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell)	Primäre Zelllinie, cryopreserved, pooled donor, Lot-Nr. 396Z042, #2	PromoCell
Wildtyp-Zebrafisch	WT Brassi PBS 0545	AG Köster
Zebrafisch-Flk-Mutante	TgCflk1:mcherryCAAX	AG Köster

3.1.3. Antibiotika, Enzyme und Antikörper

Tabelle 3-4: Arbeitskonzentrationen und Herstellerangaben der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Verwendete Konzentration	Hersteller
Chloramphenicol	0,2 µg/mL	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Erythromycin	0,001 µg/mL	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Gentamicin	200 µg/mL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kanamycin	100 µg/mL	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Penicillin G	100 µg/mL	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	100 µg/mL	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 3-5: Verwendete Enzyme und deren Hersteller

Enzym	Konzentration	Hersteller
Accutase (Enzym-Mix)	-	eBioscience
Proteinkinase K	20 mg/mL	HZI Kooperationspartner
Lysozym	20 mg/mL	HZI Kooperationspartner
LongAmp® Polymerase	2.500 U/mL	New England Biolabs
Q5-Polymerase	2.000 U/mL	New England Biolabs

Tabelle 3-6: Verwendete Komponenten in den statischen Infektions-Assays

Komponenten	Herkunft
Heparin	Roth, Deutschland
Histamin	Sigma, Schweiz
N-Acetyl L-cystein	Roth, Deutschland
Long Nonapeptid (A-L-R-Y-G-A-E-I-F-H-A-L-K-K-I-L-K-S-R-G-L-E-T-A)	HZI ,AG Brönstrup, Deutschland
Short Nonapeptid (A-L-R-Y-G-A-E-I-F-H-A-L-K-K-I)	HZI ,AG Brönstrup, Deutschland
Plasmin-Bindungspetid (F-Y-D-K-E-R-K-V-Y-D-T)	HZI, AG Brönstrup, Deutschland
RGD-Peptid (R-G-D)	Bachem, Deutschland
RGE-Peptid (R-G-E)	Bachem, Deutschland
Von Willebrand Faktor aus humanem Plasma	Merck; Calbiochem, USA

Tabelle 3-7: Arbeitskonzentrationen und Herstellern zu verwendeten Antikörpern

Antikörper	Konzentration	Arbeitskonzentration/ Verdünnung	Hersteller
Kaninchen anti-Pneumokokken	k. A.	1:50	Eurogentec
Ziege anti-Kaninchen Alexa 488	2 mg/mL	13,3 µg/mL 1:150	Santa Cruz
Ziege anti-Kaninchen Alexa 568	2 mg/mL	20 µg/mL 1:100	Invitrogen
Phalloidin Alexa 350	k. A.	1:1000	Abcam CytoPainter
Maus anti-vWF	200 µg/mL	2 µg/mL 1:100	Santa Cruz

Ziege anti-Maus AK-AP	600 µg/mL	0,06 µg/mL 1:10.000	Thermo Scientific Fisher
Ziege anti-humanen VWF-FITC	10 mg/mL	1:50 und 1:200	Abcam

3.1.4. Medien, Puffer und Färbelösungen

Tabelle 3-8: Zusammensetzung von Medien und Puffern

Medium / Puffer	Bestandteil	Menge
Todd-Hewitt & Yeast	Hefeextrakt	10,0 g/L
(THY) Medium, pH 7	Todd-Hewitt-Broth	30,0 g/L
	(Agar)	15,0 g/L
Lysogeny broth (LB) Medium, pH	Hefeextrakt	5,0 g/L
	Caseinpepton	10,0 g/L
	NaCl	5,0 g/L
	(Agar)	15,0 g/L
Phosphate buffered saline	NaCl	80,0 g/L
(PBS) Puffer 10 x	KCl	2,0 g/L
	Na ₂ HPO ₄	14,4 g/L
	KH ₂ PO ₄	2,4 g/L
PBS-Tween Puffer	PBS Puffer	1 L
(0,1% / 0,05%)	Tween 20	1 mL / 500 µL
TAE Puffer 50x, pH	TRIS	242,0 g/L
	Essigsäure 100%	57,1 mL/L
	EDTA	18,6 g/L
DNA-Probenpuffer 6x	Bromphenolblau	350 µM

	Xylencyanol FF	450 μ M
	Glycerin	50 % (v/v)
SDS-Puffer 10 x	SDS	10,0 g/L
	TRIS	30,3 g/L
	Glycin	144,0 g/L
SDS-Probenpuffer 4 x	Glycerin	30,0 mL
	β -Mercaptoethanol	15,0 mL
	SDS	10,0 g
	BromphEnolblau	0,2 g
Towbin-Puffer	TRIS	25 mM
	Glycin	150 mM
	Methanol	200 mL/L
Alkalische Phosphatase	Tris-HCl pH 9,5	100 mM
(AP) Puffer	NaCl	100 mM
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	5 mM
VWF-Puffer, pH 6,8	NaCl	100 mM
	Glycerin	100 mM
	Natriumcitrat	25 mM
HBS-Puffer, pH 7,0	NaCl	150 mM
	HEPES	20 mM
	MgCl ₂	1 mM
30% (v/v) Danieau, pH 7,2	Mg ₂ SO ₄	0,12 mM
	KCl	0,21 mM
	Ca(NO ₃) ₂	0,18 mM
	NaCl	17,4 mM
	HEPES	1,5 mM

Na-Carbonat Puffer, pH 9,2 in ddH ₂ O	Na ₂ CO ₃	100 mM
0,02% Tricaine in 30% (v/v) Danieau	Ethyl 3-amino benzoat methanesulfon Säure	0,02% (v/v)

Die aufgeführten Lösungen wurden für Coomassie- und Silberfärbung von SDS-Gelen verwendet. Pro Gel werden 50 mL der jeweiligen Lösung benötigt. Die Zugabe von Formaldehyd erfolgte jeweils direkt vor Gebrauch.

Tabelle 3-9: Zusammensetzung der verwendeten Färbelösungen

Lösung	Bestandteil	Menge
Fixierlösung	Ethanol	50%
	Essigsäure	12%
	dH ₂ O	ad 50mL
	Formaldehyd 37%	25 µL
Sensitizerlösung	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	10 mg
	dH ₂ O	50 mL
Silberlösung	Silbernitrat	0,1 g
	dH ₂ O	ad 50,0 mL
	Formaldehyd 37%	37,5 µL
Entwicklerlösung	Na ₂ CO ₃	1,5 g
	Sensitizerlösung	1,0 mL
	dH ₂ O	ad 50,0 mL
	Formaldehyd 37 %	25,0µL
Stopplösung	Glycin	0,5 g

	dH ₂ O	ad 50,0 mL
Coomassie Silber Blau	α -Phosphorsäure	100,0 mL/L
	Ammoniumsulfat	100,0 g/L
	Coomassie-Brilliant-Blau G-250	1,2 g/L
	Ethanol	20% (frisch dazu)

Tabelle 3-10: Verwendete Chemikalien und weitere Substanzen

Chemikalie / Substanz	Hersteller
Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agarose	AppliChem GmbH
Agarose, Type IX-A, Ultra Low gelling	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bacto Todd-Hewitt-Broth	Becton Dickinson GmbH
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Promega GmbH
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG
Columbia Agar mit 5% Schafblut	Becton Dickinson GmbH
Dako Mounting Medium	Agilent Technologies
DNA-Leiter GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Endothelial Cell Basalmedium 2	PromoCell GmbH
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	PromoCell GmbH
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG

Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Formaldehyd 37%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hefeextrakt	Becton Dickinson GmbH
His-Tag labeling Dye „RED-tris-NTA Dye“	NanoTemper Technologies GmbH
Künstliches Meersalz „Instant Ozean Seesalz“	Aquarium Systems
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
KCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Na ₂ CO ₃	Carl Roth GmbH & Co. KG
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
NaOH	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdodecyl-sulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumthiosulfat	Merck KGaA
Nitroblau-Tetrazolium (NBT)	Promega GmbH
Paraformaldehyd 16% (PFA)	Electron Microscopy Sciences
PBS-T Puffer 5 x	NanoTemper Technologies GmbH
PhEnol	Carl Roth GmbH & Co. KG

Proteinleiter PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Roti-Nanoquant 5 x	Carl Roth GmbH & Co. KG
RPMI 1640 Medium 2 mM L-Glutamin	GE Healthcare Europe GmbH
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate	Sigma Aldrich
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton (X-100)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypton	Becton Dickinson GmbH
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG
von Willebrand Faktor (aus humanem Plasma)	Merck Chemicals GmbH

Tabelle 3-11: Verwendete Fertigsysteme (Kits)

Fertigsystem	Bezeichnung	Hersteller
PCR Purifikation Kit	QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen
Plasmid preparation Kit	QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen
Ni-NAT Protein purification Kit	Protino [®] Ni-TED 2000 Packed Columns	Macherey-Nagel
MST Protein markierungs Kit	RED-tris-NTA Kit	NanoTemper Technologies

3.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.1. Kultivierung von *Streptococcus pneumoniae*

Zur Kultivierung wurde Zellmaterial des jeweiligen Pneumokokken-Stammes aus dem Glycerinstock bei -80 °C mit einer Impföse auf eine Colombia Blutagarplatte (CNA, BD, Columbia Agar mit 5% Schafblut) überimpft. Bei Bedarf wurde die CNA-Platte jeweils vorher mit dem zu verwenden Antibiotikum versehen. Anschließend wurde die Platten über Nacht (ü.N.) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um sie dann am folgenden Morgen für eine Flüssigkultur einzusetzen. Die Flüssigkultivierung erfolgte in 50 mL Schraubdeckelgefäßen in einem Volumen von 20 mL THY mit 1% Hefeextrakt (Becton Dickinson, USA, siehe Tabelle 3-8) stehend bei 37°C und 5% CO₂. Nach der Einstellung der Start OD₆₀₀ von 0,15 wurde ggf. das jeweilige Antibiotikum hinzugegeben und das Schraubdeckelgefäß mit leicht geöffnetem Deckel bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 0,35 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur zwei Mal bei 1.000xg sedimentiert und mit 10 mL sterilem PBS gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde das Sediment in 1 mL PBS resuspendiert und anschließend auf die gewünschte OD₆₀₀ eingestellt.

3.2.2. Kryokonservierung von *Streptococcus pneumoniae*

Zur Kryokonservierung wurde der Pneumokokkenstamm wie oben beschrieben auf Festmedium kultiviert und das Bakterienmaterial in 1 mL Kryomedium mit einem sterilen Wattetupfer überführt. Als Medium für die Kryokonservierung wurden 70% (v/v) THY-Medium und 30% (v/v) Glycerin (80% v/v mit sterilem ddH₂O) verwendet und die Bakterien anschließend bei -80°C gelagert.

3.2.3. Hitzeinaktivierung von Pneumokokken

Um in entsprechenden Infektionsversuchen testen zu können, ob die beobachteten Effekte auf einen intakten Stoffwechsel der Bakterien zurückzuführen sind, wurde die Stoffwechselaktivität durch 10-minütige Kultivierung bei 65°C inaktiviert. Die Inaktivierung wurde durch Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) überprüft.

3.2.4. Inkubation der Pneumokokken mit human VWF zur Vorbereitung der Infektionsanalysen

VWF ist humanes Glykoprotein, das als Lyophilisat von der Firma Merck bezogen wurde (siehe

Tabelle 3-10). Das Protein wird mit einem speziellen Puffer bei 37°C resuspendiert (siehe Tabelle 3-8) und vor Verwendung bei -20°C in Aliquots gelagert. Der Auftauprozess erfolgt für 5 min bei 37°C, um die Ausbildung von Aggregat-Bildung zu vermeiden. Zur Inkubation mit VWF wurden die Bakterien wie in 3.2.1 beschrieben kultiviert und photometrisch auf eine OD₆₀₀ von 1 in PBS eingestellt. Dies entspricht einer Anzahl von 1×10^9 KBE/mL. Diese Bakterienmenge wurde für 1 h bei 37°C mit 3 µg/mL VWF in einem Volumen von 1 mL Zellkulturmedium ohne Zusatz von FCS oder anderen potenziell inhibitorisch wirkenden Zusätzen inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen VWF durch Sedimentation und Waschen mit PBS wurde die OD₆₀₀ erneut bestimmt und eine KBE/mL von 2×10^8 eingestellt.

3.2.5. Kultivierung von *Escherichia coli*

In dieser Arbeit wurde der *E. coli*-Stamm Stamm M15 zur Proteinexpression der Pneumokokken Eno genutzt und der Stamm K12 diente als Referenzstamm für die Analyse der Phagozytoserate im THP-1 Makrophagen Assay. Zur Kultivierung wurde mithilfe einer Impföse Zellmaterial aus einem Glycerinstock auf eine LB-Platte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Eine der gewachsenen Kolonien wurden als Inokulum für eine 5 mL LB-Flüssigkultur verwendet. Die Flüssigkultur wurde auf einem Schüttelinkubator bei 37°C und 180 rpm ü.N. kultiviert. Die Kultur für die Proteinexpression wurde wie unter 3.3.1 beschrieben kultiviert. Der Stamm K 12 wurde wie unter Kapitel 3.5.4 beschrieben weiter behandelt.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Proteinexpression in *Escherichia coli*

Der *Escherichia coli* Stamm M15 enthält das Expressionsplasmid pQE30Eno sowie ein Repressionsplasmid und wurde zur rekombinanten Produktion der Pneumokokken Enolase (Eno) aus dem Stamm D39/SP41 genutzt. Die Kultivierung zur Proteinproduktion erfolgte aus einem Glycerinstock auf LB-Festmedium, dem für *E. coli* M15 zur Plasmidselektion 50 µL

Ampicillin (100 µg/mL) und 50 µL Kanamycin (100 µg/mL) zugesetzt wurden bei 37°C und 5% CO₂ für 24 h. Am Folgetag erfolgte eine Vorkultur in 50 mL LB-Flüssigmedium ü.N. bei 37°C unter Schütteln bei 180 rpm. Die Hauptkultur wurde mit einem Volumen von 500 mL LB-Flüssigmedium nach Zugabe von 5 mL der Vorkultur und 500 µL Ampicillin und Kanamycin (100µg/mL) beimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,8 – 0,9 bei 37°C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Ab Erreichen dieser OD₆₀₀ wurde die Proteinexpression mit 500 µM Isopropylthiogalactosid (IPTG-b, Gerbu) induziert und über 24 h bei 17°C und 180 rpm schüttelnd inkubiert.

Anschließend wurde die Kultur 20 min bei 2.000xg und 4°C sedimentiert und ü.N. bei -20°C eingefroren. Nach erneuter Resuspension auf Eis, wurden die Sedimente gevortext und anschließend mit 20 mL HBS-Puffer (Zusammensetzung in Tabelle 3-8) vermischt, der im Gegensatz zu PBS eine geringe Proteinausfällung verursacht. Die Eno würde bei PBS als Puffer schneller Ausfallen, da das zentrale Mg²⁺-Ion der Eno mit dem Phosphat aus dem PBS reagiert. Durch Zugabe des steril-filtrierte MgCl₂ wurde die Proteinstabilität der Eno erhöht (Ehinger *et al.*, 2004).

3.3.2. Zell-Aufschluss über French Press und vorbereiten für die Aufreinigung

Zum Aufschließen der Bakterienzellen wurde die mechanische Lyse durch French Press (Thermo electron corporation, Polytec FRENCH® Pressure Cell Press) angewendet. Hierbei wird die Bakterienlösung über hohem Druck (1.180 PSI) durch einen Zylinder (SIM-AMINCO French Pressure Cell, 40.000 PSI) gepresst. Hierfür wurde der bei 4°C vorgekühlte French Press-Zylinder in zwei aufeinanderfolgenden Lysevorgängen mit der Bakteriensuspension befüllt und diese bei maximalem Druck von 1.160 PSI aufgeschlossen. Anschließend wurden die lysierten Bakterienreste bei 20.000xg für 1.5 h bei 4°C sedimentiert und der Überstand zur affinitätschromatischen Reinigung des Eno-Proteins weiterverwendet (siehe 3.3.3).

3.3.3. Affinitätschromatographische Aufreinigung des His6-getaggten Eno-Proteins von *S. pneumoniae*

Das Prinzip der affinitätschromatographischen Protein-Aufreinigung beruht auf einer hochaffinen Bindung von Nickel-Ionen mit den Polyhistidinresten des rekombinanten Proteins. Für die Chromatographie wurden gepackte Ni-TED Säulen von Macherey-Nagel verwendet (Protino® Ni-TED 2000 Packed Columns, Macherey Nagel). Die Säulen wurden nach Angaben

des Herstellers äquilibriert und der aus der mechanischen Lyse gewonnene Kulturüberstand wurde auf die Säulen gegeben. Durch zweimaliges Waschen der Säule mit 4 mL HBS mit 10 mM Imidazol wurden ungebundene, verunreinigende und weniger affin gebundene Proteine entfernt. Die Elution des Proteins erfolgt mit HBS Puffer mit 250 mM Imidazol, der als Histidin-Strukturanalogon die Eno von der Matrix verdrängt. Von jedem Reinigungsschritt wurden Aliquots zur Proteinkonzentrations-Messung nach Bradford (siehe 3.3.4) verwendet. Die Reinigungseffizienz und Proteinqualität wurde durch standardisierte SDS-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie Brilliant-Blue Färbung bestimmt (Kapitel 3.3.5 und 3.3.6). Die qualitativ und quantitativ besten Fraktionen wurden vereinigt und durch Dialyse in HBS Puffer mit 1 mM MgCl_2 in Slide-A-Lyzer Dialyse Kassetten (Thermo Scientific®, MW Cut off 20 KDa) vom Imidazol befreit. Die Dialyse erfolgt über 24 h bei 4°C unter leichtem rühren. Im Anschluss wurde erneut die Proteinkonzentration bestimmt und die Proben bei -20°C gelagert.

3.3.4. Proteinkonzentrations-Bestimmung nach Bradford

Die Proteinanalyse nach Bradford ist eine photometrische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Das Bradford-Reagenz (5x Roti-Nanoquant, Roth) hat im Absorptionsspektrum ein Maximum bei 470 nm und bildet mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe, die das Absorptionsmaximum in den blauen Bereich auf 595 nm verschieben. Die photometrische Messung ermöglicht im Vergleich zu einer BSA-Konzentrationsreihe als Referenz die Bestimmung der unbekannten Proteinkonzentration. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.3.5. Proteinauftrennung mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese

Mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es möglich Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Die Zusammensetzung der SDS-Gele-Lösungen ist in Tabelle 3-9 aufgeführt. Von den Proteinproben wurde mindestens 1 µg Protein-Lösung auf ein Gel aufgetragen. Hierfür wurden die Proteinproben zuerst mit dem 4 x SDS-Probenpuffer vermischt und zur Denaturierung bei 95°C für 5 min erhitzt. Der Probenpuffer enthielt zusätzlich β -Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken reduziert. Das SDS lagert sich an die Proteine an und bildet eine einheitlich negativ geladene Moleküloberfläche, so dass die Proteine nach Molekularmasse zum Pluspol wandern. Pro Gel wurde ein konstanter Strom von

45 mA angelegt. Mit Hilfe des Größenmarkers Prestained Protein Ladder (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) konnte das relative Molekulargewicht bestimmt werden.

Tabelle 3-12: Zusammensetzung des verwendeten Polyacrylamidgels

Gel	Reagenzien	mL (pro mL Gel)
Sammelgel (5%)	30% Acrylamid/Bisacrylamid	0,165
	4 x Sammelgelpuffer	0,25
	Wasser	0,55
	10% Ammonium Persulfate	0,01
	TEMED	0,001
Trenngel (12%)	30% Acrylamid/Bisacrylamid	0,4
	4 x Trenngelpuffer	0,25
	Wasser	0,34
	10% Ammonium Persulfate	0,01
	TEMED	0,001

3.3.6. Coomassie-Brilliant-Blue- und Silbernitratfärbung

Im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese erfolgt die Proteinvisualisierung durch ü.N.-Schwenken bei 80 rpm mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue (Roth, Coomassie-Brilliant-Blau G-250) in 20% (v/v) Ethanol oder Methanol. Der Farbstoff bindet im sauren Milieu an basische Aminosäuren. Das Gel wurde nach der Färbung bei 80 rpm mit dH₂O entfärbt und mit einer Digitalkamera zur Dokumentation fotografiert. Alternativ zur Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung wurde die sensitivere Silberfärbung eingesetzt.

Für die Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) wurden die in Tabelle 3-9 aufgeführten Lösungen verwendet. Alle Schritte wurden auf einem Schüttelinkubator durchgeführt. Das Gel wurde zuerst für 2 h in Fixierlösung gelegt, um die Proteine zu fixieren und das SDS herauszuwaschen. Danach wurde das fixierte Gel zweimal für je 20 min mit 50% Ethanol und kurz mit dH₂O gewaschen, um einen neutralen pH-Wert zu erreichen. Anschließend wurde das Gel 1 min in der „Sensitizerlösung“ mit Natriumthiosulfat geschwenkt, um die Empfindlichkeit der Proteine

für das nachfolgende Silbernitrat zu steigern und damit den Kontrast zu erhöhen. Es folgten zwei Waschschrte mit dH₂O für jeweils 20 s, um das Natriumthiosulfat der „Sensitizerlösung“ zu entfernen. Die Silberlösung wurde für maximal 20 min auf das Gel gegeben. Darauf folgten zwei Waschschrte, um überschüssiges Silbernitrat zu entfernen. Das Gel wurde in die Entwicklerlösung gelegt, bis die Banden durch die Fällung der Silberionen sichtbar wurden. Die Fällungsreaktion des Silbers wurde durch 30-minütiger Inkubation in der Stopplösung beendet. Das Färbeergebnis wurde durch eine Kameraaufnahme dokumentiert und das Gel getrocknet.

3.3.7. Proteindetektion und Interaktionsstudien nach Western Blot-Immobilisierung und Peptide Spot Assay

Der Western Blot dient der spezifischen Visualisierung von aufgetrennten Proteinen aus einer SDS-Gelelektrophorese, die zuvor auf eine stabilere Matrix aus Nitrocellulose oder PVDF transferiert worden sind zur Visualisierung von Protein-Interaktionen. Die spezifische Visualisierung erfolgt hierbei über Antikörper und anschließende Detektion der Antikörperbindung über einen chromogenen Substratumsatz. Der Proteintransfer erfolgte in dieser Arbeit über ein Semi-dry Verfahren auf Polyvinyliden-Difluorid-(PVDF)-Membranen (GE Healthcare). Der Blot setzte sich aus drei Whatman-Filterpapieren, gefolgt von einer PVDF-Membran und dem Gel und weiteren drei Whatman-Filterpapieren zusammen. Alle Blot-Komponenten wurden vor dem Transfer in Towbin-Puffer getränkt, um die Leitfähigkeit zu gewährleisten. Der Transfer wurde für 45 min bei 25 V durchgeführt. Anschließend wurde die PVDF-Membran in PBS gewaschen.

Um Protein-Interaktionen unter nicht-denaturierenden Bedingungen nachzuweisen, wurden die Proteine nativ auf eine Nitrocellulosemembran aufgetropft. Hierbei bleibt die strukturelle Proteinkonformation erhalten, die für Protein-Interaktionen von Bedeutung sein kann.

Zur weiteren Proteindetektion erfolgte eine Blockierung der Membran für 2 h bei RT oder ü.N. bei 4°C in Blockierungslösung (3% BSA (Eno-Detektion) in PBS oder 5% Magermilchpulver in TBST (VWF-Detektion)).

3.3.8. VWF Bindungsstudien mit der bakteriellen Enolase in Peptid-Spot-Arrays

Nach der Proteinimmobilisierung der Eno und weiterer Oberflächenproteine wurden die Western Blots und Spotmembranen für VWF-Bindungsstudien verwendet. Die Nitrocellulosemembranen wurden zunächst für 2 h bei R.T. oder ü.N. bei 4°C in 20 mL 3%

BSA in PBS-T oder 5% Magermilchpulver in TBST in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Hierbei wurde in Magermilchpulver blockiert, wenn eine VWF-Bindung nachgewiesen werden sollte, da diese Blockier-Lösung ein besseres Absättigungsergebnis bei einer VWF-Detektion erreichte.

Danach wurden sie dreimal mit je 20 mL PBS-T (0.1% Tween 20) gewaschen. Die Inkubation der immobilisierten Proteine mit VWF fand über Nacht bei 4°C statt. Hierfür wurden 20 µg VWF in 20 mL PBS in jedes Reaktionsgefäß gegeben. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal mit 20 mL PBS-T gewaschen. Zum Nachweis der VWF-Bindung wurde ein VWF-spezifischer Primär-Antikörper aus der Maus (siehe Tabelle 3-7) in einer Verdünnung von 1:100 in 0.5% BSA in 20 mL PBS-T mit den Membranen inkubiert. Vor der Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper wurde die Membran dreimal mit PBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde ein anti-Maus-Antikörper aus der Ziege (siehe Tabelle 3-7) verwendet, der an alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt war. Die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper erfolgte für 2 h in einer Verdünnung von 1:10.000 in PBS-T mit 0.5% BSA. Nach weiteren Waschrissen mit PBS-T und PBS wurde die Membran für 10 min in AP-Puffer (siehe Tabelle 3-8) äquilibriert. Die Visualisierung erfolgte mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) nach einem von Blake *et al.*, 1984 veröffentlichten Prinzip. Die AP spaltet unter alkalischen Bedingungen eine Phosphatgruppe vom BCIP ab woraufhin die Indoxylgruppe mit einer Zweiten dimerisiert und als Dehydroindigo (lila) ausfällt. Dabei werden Wasserstoffionen frei, die NBT zu Diformazan reduzieren. Dies zeigt sich als kräftiger blauer Niederschlag (Blake *et al.*, 1984). Hierzu wurden 20 mL AP-Puffer mit 66 µL NBT und 33 µL BCIP (siehe

Tabelle 3-10) mit den Membranen inkubiert. Die Reaktion wurde mit dH₂O abgestoppt, sobald Signale erkennbar waren. Zur Kontrolle unspezifischer Antikörperdetektionen wurden die gleichen Western Blots und Peptid-Dot-Spots entweder ohne das Liganden-Protein VWF oder nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert.

3.3.9. VWF Bindungsstudien mit der bakteriellen Enolase unterteilt in Bindungsmotive als Peptid-Array

Zu näheren Untersuchung der VWF-Bindung der Pneumokokken Eno wurde die Sequenz der Eno in Peptide aus je 15 Aminosäuren (AS) mit 12 überlappenden AS und einer sich jeweils um drei AS verschiebenden Sequenz eingesetzt. Diese Peptide wurden synthetisch hergestellt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Die Membran wurde hergestellt

von der Forschungsgruppe Peptidsynthese von Dr. Werner Tegge am HZI Braunschweig. Als Positiv-Kontrolle für die Antikörpernachweis-Reaktion wurde zusätzlich 1 µg VWF-Protein auf eine kleine Nitrocellulosemembran aufgetropft und diese bei allen Inkubationsschritten der Peptidmembran mit Ausnahme der VWF-Inkubation mitgeführt. Bei den im folgenden geschilderten Protokoll wurde jeder Inkubationsschritt in einem Volumen von 20 mL durchgeführt. Jeder Schritt wurde für 10 min auf dem Schwenker durchgeführt, falls er nicht anders beschrieben wird.

Zu Beginn wurde die Peptid-Membran zur Befeuchtung mit 70% Ethanol (p.a.) betropft. Im Anschluss wurde sie drei Mal mit TBS gewaschen und ü.N. in Blockierungslösung abgesättigt. Diese setzt sich aus 20 mL 10 x Blockingbuffer (Sigma B6429, auf Casein-Basis) 80 mL T-TBS (0,005% Tween 20) pH 8 und 5 g Saccharose (5%) zusammen. Der pH wurde auf 7,6 mit NaOH eingestellt.

Die Membran wurde nach dem Absättigen mit T-TBS gewaschen und anschließend mit 20 µg VWF (Merck) ü.N. in PBS inkubiert. Darauf wurde die Membran wieder mit T-TBS gewaschen, um nicht-gebundenen VWF zu entfernen. Im Anschluss wurde zur Detektion des VWF mit 2 ng/mL eines monoklonalen anti-VWF spezifischen Antikörpers (Aus Maus, Santa Cruz) für 3,5 h bei R.T. inkubiert. Die Membran wurde danach drei Mal mit TBS gewaschen und mit dem Sekundär-Antikörper, einem anti-Maus-Horseradish-Peroxidase (HRP)-konjugierten Antikörper aus Ziege (Dinova) für 1,5 h inkubiert, um die Bindung des Primär-Antikörpers mit einer chemilumineszenten Farbreaktion mit Chloronaphthol (1-Step™ Chloronaphtho, Pierce) als chromogenes Substrat nachzuweisen. Chloronaphthol fällt nach der Enzymreaktion als violetter Niederschlag aus. Die Farbreaktion wird in einem Volumen von 20 mL PBS durch Zugabe von 3% (v/v) H₂O₂ gestartet und maximal 30 min inkubiert. Anschließend wird die Membran noch zwei Mal mit PBS gewaschen und zur Dokumentation fotografiert. Die gleiche Membran wurde wiederverwendet, um den Anteil unspezifischer Bindungssignale bestimmen zu können. Zu diesem Zweck wurde die Membran zunächst einer speziellen Waschprozedur unterzogen, die sämtliche gebundenen Antikörper und den gebundenen Liganden entfernt, ohne die immobilisierten Peptide zu beeinträchtigen.

Die Membran wird dazu zwei Mal mit dH₂O gewaschen und danach mit DMF inkubiert, um die Antikörperbindungen zu lösen. In einem nächsten Schritt wird zusätzlich zu dem DMF noch eine Inkubation für 10 min in einem Ultraschallbad durchgeführt, um ein vollständiges Ablösen der Antikörper zu erreichen. Die Membran wird erneut mit DMF gewaschen und anschließend drei Mal mit dH₂O gespült. Mit den darauffolgenden Inkubationsschritten soll der gebundene

Ligand VWF von den Proteinspots entfernt werden. Dazu wird zuerst Puffer A eingesetzt, der sich aus 8 M Harnstoff, 1% (w/v) SDS und 0,5% (v/v) β -Mercaptoethanol zusammensetzt. Vor Zugabe des β -Mercaptoethanols wird der pH auf 7.0 mit Essigsäure eingestellt. Puffer A wirkt denaturierend und löst den VWF von den Peptiden auf der Membran. Die Inkubation der Membran mit Puffer A erfolgt jeweils für 5 min zuerst auf dem Schwenktisch und anschließend im Ultraschallbad. Diese Inkubationsfolge wird nochmals wiederholt. Danach wird die Membran drei Mal mit dem Puffer B gewaschen, der 10% (v/v) Essigsäure, 50% Ethanol (p.a.) und 40% (v/v) dH₂O enthält. Dieser Puffer entfernt die Reste des denaturierenden Puffers A von der Membran und zusätzlich die restlichen abgelösten VWF-Moleküle. Zum Abschluss wird die Membran noch drei Mal mit 70% Ethanol (p.a.) gewaschen und kann entweder für die Antikörperkontrollen genutzt werden oder nach dem Trocknen ü.N. bei - 20°C gelagert werden.

3.3.10.Densitometrische Analyse der Peptid-Spot- und Peptid-Array-Membranen

Die quantitative Auswertung der Membransignale erfolgte durch Software-basierte Bestimmung der Pixel-Intensität (PI) der Spotsignale mit dem Programm ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018). Für eine densitometrische Auswertung wurden die Membranen nach der Chemilumineszenz-Entwicklung im jpg-Bildformat eingescannt und anschließend für die Weiterbearbeitung in Image J in eine 8-bit Grafik konvertiert. Die Fläche der einzelnen Interaktionssignale wurde mit einem Rechteck markiert. Zum Signalvergleich wird ein Histogramm erstellt und das Hintergrundsignal abgezogen. Die Intensitätswerte werden zur graphischen Darstellung und zur statistischen Analyse in Excel (Microsoft) kopiert und als Balkendiagramme dargestellt.

3.3.11.Darstellen der Eno-Molekülstruktur mit der Software PyMol

Die Darstellung der putativen VWF-Bindungssequenzen im Eno-Molekül erfolgte mit dem kostenfreien Softwareprogramm PyMol (Version 2.2). In früheren Arbeiten aus der eigenen AG wurde die oktamere Molekülstruktur der Eno eines Serotyp 2 Pneumokokkenstammes (ATCC 11733) auf Basis von Röntgenkristallstrukturanalysen in einer Auflösung von 2.0 Å bereits aufgeklärt (Ehinger *et al.*, 2004). Der PDB Eintrag lautet DOI: 10.2210/pdb1W6T/pdb. Anschließend wurden die VWF-Bindungs-Motif-Sequenzen in der Primärsequenz farbig markiert und das oktamere Molekül räumlich abgebildet.

3.3.12. Microscale Thermophorese (MST) zur Charakterisierung der VWF-Eno-Interaktion

Microscale Thermophorese (MST) ist eine optische Analysemethode, bei der die Komplexbildung zwischen zwei Proteinpartnern in Lösung durch Änderung der spezifischen Diffusion entlang eines Temperaturgradienten detektiert und quantifiziert werden kann. Die Proteinprobe befindet sich hierbei in einer Kapillare mit einem Durchmesser von 100 µm und wird von einem Infrarot-Laser (IR-Laser) an einem Punkt erhitzt. In Abhängigkeit der Hydrathülle, der Ladung und der Masse wandern die Proteinmoleküle mit einer spezifischen Geschwindigkeit aus dem erhitzten Fokus heraus. Findet eine Interaktion zwischen den Molekülen statt, so weist der größere Komplex ein anderes Diffusionsverhalten auf, als das ungebundene Molekül. Die Visualisierung erfolgt anhand einer Fluoreszenzmarkierung eines der Bindungspartner. Durch dichromatische Spiegel wird der Strahlengang des IR-Lasers in den einer Leuchtdiode (LED) gelenkt und zur Fluoreszenzanregung genutzt. Die Thermophoresedetektion bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen ermöglicht die Berechnung von Bindungskurven und die Ermittlung von Dissoziationskonstanten und weiterer Bindungsparameter (Wienken *et al.*, 2010; Jerabek-Willemsen *et al.*, 2011).

Mit der MST-Messung wurde in dieser Arbeit die Interaktion der in *E. coli* rekombinant produzierten Pneumokokken-Eno mit dem heterolog exprimierten eGFP-fusionierten-VWF-Monomeren analysiert. Diese Monomere wurden von Prof. Dr. Reinhard Schneppenheim aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um rekombinant in HEK-293 Zellen produzierte VWF-Monomere, die in der CTCK-Domäne mutierte sind und zusätzlich am N-Terminus ein eGFP aufweisen. Die Monomere eignen sich für die MST-Messung, da sie durch die Punktmutation in der CTCK-Domäne nicht mehr in der Lage sind, zu dimerisieren und zu multimerisieren. Dadurch wird das Bindungsergebnis nicht verfälscht. Die Eno wurde mit Hilfe eines Markierungskits von Nanotemper (RED-tris-NTA Kit, NanoTemper Technologies) nach Angaben des Herstellers mit einem roten Farbstoff konjugiert. Basierend auf der Annahme einer oktameren Eno-Struktur (Ehinger *et al.*, 2004) wurden äquimolare Mengen der Eno und des Farbstoffs eingesetzt. Zur Überprüfung des Auftretens unterschiedlicher Multimerisierungsstadien wurde die Eno einer konzentrationsabhängigen Bindungsuntersuchung unterzogen. Für diese Kontrolle wurde eine Bindungsmessung mit markierter Eno und nicht markierter Eno durchgeführt. Des Weiteren

wurde die geeignete Kapillarbeschichtung und die Effizienz der Fluoreszenzmarkierung mittels *Cap Scan* bestimmt. Um eine Überlagerung der Messergebnisse durch das Fluoreszenzsignal des GFP-Tags am VWF auszuschließen, wurden die VWF-Monomere ebenfalls einzeln im *Cap Scan* mit dem Rot-Detektor gemessen. Als weitere Kontrolle wurden Bindungsmessungen mit einem GFP-Protein durchgeführt, das von Dr. S. Wienecke, TU Braunschweig bereitgestellt wurde. Sämtliche Messungen wurden mit Standardkapillare am Rotdetektor des *Monolith NT.115* (NanoTemper Technologies) aus der AG von Dr. Andrea Scrima am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig mit 40% LED Leistung und 40% MST Leistung durchgeführt. Für die VWF-Eno-Bindungsanalyse wurde zunächst eine serielle 1:2 Konzentrationsreihe von 320 nM bis 0,0098 nM der VWF-Monomere hergestellt. Anschließend wurde jede VWF Konzentration für 30 min im Dunkeln mit 25 nM Fluoreszenzmarkierter Eno inkubiert. Die Messungen erfolgten in drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten.

3.2.13 Surface Plasmon Resonanz-Messung (SPR) zur Charakterisierung der VWF-Eno-Interaktion

Die auf dem gleichnamigen physikalischen Phänomen beruhende Oberflächenplasmonresonanz (englisch Surface Plasmon Resonanz, SPR) erlaubt die Detektion von Molekülbindungen untereinander an einer Oberfläche und wurde in dieser Arbeit neben der MST genutzt, um die Dissoziationskonstante (K_d) der Bindung zwischen Eno und dem VWF zu bestimmen. Die Messungen wurden von einem Kooperationspartner aus der AG Prof. Sven Hammerschmidt in Greifswald durch Dr. Thomas Kohler durchgeführt. Zudem wurden auch Messungen mit den A-Domänen des VWF getätigt, um die Bindungsregion des VWF näher einzugrenzen. Die VWF-A-Domänen wurden von Prof. Dr. Reinhard Schneppenheim aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um rekombinant in HEK-293 Zellen produzierte Proteine mit einem His6-Tag. Im Falle des eingesetzten Biacore T200 (GE Healthcare, München) war es durch ein anderes Messverfahren möglich, welches nicht auf der Veränderung der Hydrathülle beruht, den physiologischen VWF einzusetzen anstatt des eGFP-VWF-Monomers. Für die Untersuchungen erfolgte die kovalente Immobilisierung der Eno an einen CM5-Chip.

Die SPR ermöglicht Bindungsanalysen in Größenordnungen von Molekülen bis hin zu Viren und benötigt hierbei keine Markierung der Proben. Eine Bindung wird über die Veränderung des Brechungsindex in Abhängigkeit von Masseänderungen auf der Chipoberfläche detektiert. Der Chip, mit dem der Ligand in das Mikrofluidik-System eingeführt wird, besteht aus einem Glas, das mit einem dünnen Goldfilm bedampft ist. Von diesem Goldfilm wird der für die Detektion genutzte Lichtstrahl reflektiert. Erfolgt zwischen dem an die Dextran-Matrix gebundenen Liganden und dem Analyt eine Bindungsreaktion, so erhöht der Bindungskomplex die Masse auf dem Chip und der Winkel des von der Goldschicht reflektierten Lichts ändert sich. Diese Änderung des Lichtwinkels wird in einem Sensogram in Echtzeit dargestellt und kann für die qualitative Aussage, ob eine Bindung stattfindet oder nicht, bis hin zur Ermittlung der Spezifität und Affinität der Bindung sowie für Kinetiken genutzt werden.

Die Eno wurde für die SPR-Messung kovalent über eine Amin-Koppelung an die Dextran-Matrix gebunden (Bergmann *et al.*, 2003). Die Bindungsanalysen wurden in PBS-Puffer (pH 7,4) mit 0,05% Tween 20 bei 25°C und einer Flussrate von 10 µL/min durchgeführt. Der aus humanem Plasma isolierte VWF (Merck) wurde als Analyt in den Konzentrationen 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 und 10,0 µg/mL eingesetzt. Die einzelnen VWF-Domänen A1, A2 und A3 wurden in den Konzentrationen 0,0612; 0,125; 0,25; 0,5; und 1,0 µg/mL in den Bindungsstudien verwendet. Durch die Anwendung von Regenerierungsprozeduren kann die Eno-beschichteten Flusszellen des Sensorchips mehrmals zur Datenreproduktion und zur Kinetik Analyse wiederverwendet werden. Die gebundenen Analyt-Moleküle wurden von der Eno-beschichteten Chipoberfläche nach jeder einzelnen Bindungsreaktion durch Spülen mit 2,0 mM NaOH entfernt. Die Bindungsmessungen und Kinetik Analysen wurden jeweils in drei voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die Bindungsparameter der Kinetiken sowie die χ^2 -Werte wurden anhand der Sensogramdaten mit der Biacore T200 Software Version 3.0 evaluiert.

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. Transformation von *Streptococcus pneumoniae*

Zur fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung wurden Pneumokokken-Stämme mit Fluoreszenz-Konstrukten transformiert, die von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jan-Willem Veening, Universität Lausanne, Schweiz zur Verfügung gestellt wurden. Die Konstrukte [*hlpA*-

gfp)-cam] und [(*hlpA-rfp*)-cam] bestehen aus einem Gen für ein Histon-like Protein (*hlpA*), das mit einem Fluoreszenzgen (*rfp* bzw. *gfp*) fusioniert wurde und in den *hlp*-Genlokus ins Genom der Pneumokokken stabil inseriert (Kjos und Veening, 2014; Kjos *et al.*, 2015). Die Konstrukte enthalten zudem als Selektionsmarker das Resistenzgen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (Kjos und Veening, 2014). Hierfür wurden die gewünschten Pneumokokken-Stämme mit Hilfe der Konstrukte von Kijo *et al.*, 2015 transformiert nachfolgender Methode.

Für die Transformation wurde sich unter Zuhilfenahme der Kompetenz stimulierenden Peptids (CSP) die natürliche Kompetenz der Pneumokokken zu Nutze gemacht. Die Integration des Fremdens erfolgt über *Crossing over* mit zwei flankierenden Sequenzen für das *Histone-like protein A* (*hlpA*). Für die Transformation wurden die Pneumokokken auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden 1,5 mL dieser Bakteriensuspension in einem 2 mL Reaktionsgefäß mit 12,4 µL des CSP I (1 mg/mL) bei 37°C und 5% CO₂ für 12 min inkubiert. 250 µL dieser Lösung wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 60 ng des DNA-Konstruktes, für 20 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Diese Lösung wurde dann wiederum 1:10 mit THY verdünnt und für weitere 90 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 50 µL dieser Lösung auf CNA-Festmedium mit 3,6 µL einer 1 mg/mL Stocklösung Chloramphenicol plattiert und anschließend ü.N. bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden Einzelkolonien auf eine neue CNA-Platte mit Antibiotikum passagiert. Die Überprüfung der gelungenen Integration des Fluoreszenz-Konstruktes erfolgte nach DNA-Isolierung (siehe 3.4.2) durch *hlpA*-spezifische PCR (siehe 3.4.3) mit folgendem Primern: *hlpA*-up-F: AACAAAGTCAGCCACCTGTAG und dem *hlpA*-down-R: CGTGGCTGACGATAATGAGG sowie durch Fluoreszenz-Visualisierung am Mikroskop.

3.4.2. Isolation genomischer DNA aus *S. pneumoniae*

Für die DNA-Isolation wurden die Pneumokokken bis zu einer OD₆₀₀ von 0,35 in 20 mL THY kultiviert (Kapitel 3.2.1). Nach Sedimentation der Bakterienkultur wurde sie in 560 µL PBS resuspendiert und durch Zugabe von 30 µL 10% SDS und 5 µL Lysosom (20 mg/mL) lysiert. Zusätzlich wurden die Proteine mit 5 µL Proteinease K (20 mg/mL) proteolysiert. Die Lyse-Suspension wurde ü.N. bei 56°C und bei 200 rpm schüttelnd inkubiert bis die Lösung klar war. Am nächsten Tag wurden 100 µL einer 5 M NaCl-Lösung, sowie 80 µL einer auf 80°C vorgewärmten CTAB-Lösung (10 g CTAB und 4,1 g NaCl in 80 mL dH₂O) hinzugegeben, vorsichtig gemischt und bei 65°C für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Phasenaufreinigung mit einer 700 µL Phenol/Chloroform/-Isoamylalkohol-Mischung im

Verhältnis 25:24:1, welche nach Zugabe vorsichtig invertiert und bei 8.000 rpm für 5 min zentrifugiert wurde. Hierbei reichern sich die Proteine in der unteren organischen Phenolphase an, während die DNA sich hingegen im wässrigen Überstand befindet. Der Überstand wurde erneut einer Phasentrennung unterzogen und die in Lösung befindliche DNA wurde anschließend durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol für 30 min bei -20°C ausgefällt. Die Fällung wird anschließend durch Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl für 15 min sedimentiert. Der Überstand wird in 500 µL 70% EtOH aufgenommen, erneut gewaschen und abschließend getrocknet. Nach Resuspension des transparenten DNA-Sediments in 50µL ddH₂O werden die Konzentration und Reinheit der DNA am Photometer durch Messung der Quotienten bei 260/280 nm und 260/230 nm bestimmt. Die genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

3.4.3. Polymersase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Molekülen. Es werden spezifische Oligonukleotide eingesetzt die up- und downstream vom zu amplifizierenden Zielgen liegen. Je nach Zielstellung wurden unterschiedliche DNA Polymerasen eingesetzt. So erfolgt die Amplifikation zur Expressionsklonierung mit *proofreading*-Polymerasen. Die Integrationsüberprüfung nach DNA-Transformation ins Pneumokokken-Genom erfolgte durch die Q5-Polymerase (New England Biolabs). In dieser Arbeit wurde die PCR zur Sequenzüberprüfung von Klonen und zur Überprüfung der Integration von Ziel-Genen bei *E. coli* und *S. pneumoniae* eingesetzt. Die genomische DNA wurde als Template wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben isoliert. Die Zusammensetzung der PCR-Proben und die Amplifizierungszyklen sind in Tabelle 3-13 aufgelistet.

Tabelle 3-13: Zusammensetzung des Q5 PCR-Ansatzes und angewendetes PCR-Programm

Komponente	Menge [µL]	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
5 x Q5 Puffer	5,0	98	30	1
dNTPs 10 mM	0,5	98	10	35
<i>Primer</i> hlpA-up-F 10 µM	1,3	60	30	

Primer hlpA-down-R 10 μ M	1,3	72	120	1
DNA Vorlage 50 ng	1,0	72	120	
ddH ₂ O	15,6	8	∞	
Q5-Polymerase	0,3			
Endvolumen	25,0			

Nach der Vervielfältigung von DNA-Konstrukten für die Transformation wurden die PCR-Proben zur Reinigung mit dem PCR-Purifikation Kit von Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit) von Primern und Polymerase bereinigt. Von sämtlichen PCR-Produkten wurden photometrisch mit dem Nanodrop-Photometer (Thermo Fisher Scientific) die DNA-Konzentration und der Reinheitsgrad bei 260/280 nm bestimmt. Zusätzlich erfolgt die Überprüfung der Amplifikatgröße und Reinheit durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel (siehe 3.4.4).

3.4.4. DNA-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente nach ihrer Größe auftrennen. Die DNA-Proben wurden mit 4-fach konzentriertem Ladepuffer (Loading Dye) vermischt und in die Taschen eines 1% (w/v) Agarosegels geladen. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Zur relativen Größenbestimmung wurde eine 1 kB DNA-Leiter (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Auftrennung erfolgte für 30 min bei 120V. Anschließend wurden das Gel in 0.1% v/v Ethidiumbromid (EtBr) für 30 min gefärbt. Dabei interkaliert das EtBr in die große Furche der DNA-Struktur und ermöglicht die Visualisierung unter UV-Licht. Die Dokumentation erfolgte anschließend mit einer Digital-Kamera.

3.5. Zellkulturmethoden und Infektionsversuche

Die Durchführung von Zellkultur-basierten Infektionsanalysen ermöglichte die Detektion von VWF-vermittelten Effekten auf die bakterielle Adhärenz und Invasion. Hierzu wurden zwei unterschiedliche humane Zelltypen genutzt. Da in dieser vorliegenden Arbeit wissenschaftliche

Fragestellungen zum VWF-Protein im Fokus stehen, wurden die meisten Infektionsanalysen mit primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) durchgeführt. Im Gegensatz zu Epithelzellen produzieren und sezernieren die Endothelzellen der Blutgefäße das VWF-Protein. Ebenso wurden Phagozytose-Analysen mit der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie THP-1 durchgeführt.

3.5.1. Kultivierung von primären Endothelzellen

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) sind Endothelzellen, die aus Nabelschnurvenen isoliert wurden und vor der Firma PromoCell nach Reinigung und näherer Charakterisierung gekauft wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden Zellmischungen von drei Spendern verwendet, die als „pooled cells“ laut Zertifikat des Herstellers zudem eine hohe VWF-Expressionsrate aufwiesen. Generell wurde auf die Verwendung möglichst früher Proliferationsphasen geachtet, da sich der Differenzierungsstatus und das Oberflächen-Rezeptorprofil der primären Zellen mit zunehmenden Passagen ändert und sich von der physiologischen Situation entfernt (Lüttge, M., Dissertation 2011). Daher wurden für Flusskultivierungsversuche nur Zellen bis zur Passage 5 benutzt, in den statischen Infektions-Assays nur solche bis zur Passage 9. Bei den HUVECs handelt es sich um eine primäre Zelllinie, die nicht immortalisiert ist. Für die Analysen im Mikrofluidiksystem von ibidi® wurden HUVECs ausschließlich subkonfluent kultiviert, da sich die Zellen ohne vorherigen direkten Zell-Zell-Kontakt besser an die Scherstress-Einwirkung im Flusssystem anpassen. Die Zellen wurden zuerst mit 6 mL PBS gewaschen, danach wurden 7 mL Accutase (eBioscience®) zum Ablösen der Zellen aufgegeben und wenige Minuten bei 37 °C inkubiert. Bei der Accutase handelt es sich um eine Enzymmischung aus kollagenolytischen und anderen proteolytischen Enzymen. Das Ablösen der Zellen wurde mit dem Lichtmikroskop beobachtet und durch Zugabe von 3 mL Endothelzellen Endothelial growth medium (ECGM) wurden restlichen Zellen im Ablöseprozess abgespült. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Reaktionsgefäß gegeben und bei 220xg für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Sediment in 250 µL Flusskultivierungsmedium mit 5% FCS und 1 mM Mg₂SO₄ resuspendiert. Die FCS-Konzentration wurde hierbei von 2% auf 5% erhöht, um eine schnelle Proliferation zu ermöglichen. Das Mg₂SO₄ fördert die Zelladhärenz, da zur Aktivierung der zellulären Integrin-Rezeptoren für die Fokalkontakte zweiwertige Ionen förderlich sind. Für statische Infektionsanalysen im 24-Well-Format wurden die HUVECs bis zur Konfluenz in 25cm² oder 75cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Nach Ablösen der Zellen vom

Flaschenboden wurde das Zellsediment zentrifugiert und in 1 mL ECGM resuspendiert. Von der Zellsuspension wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt und die Zellzahl aus 20 µL der Zellsuspension mit einer Neubauer Zählkammer mit dem Lichtmikroskop bestimmt.

3.5.2. Kultivierung von THP-1 Zellen

Die THP-1 Zellen wurden ursprünglich aus dem Blut eines einjährigen Jungen isoliert, der an akuter monocystischer Leukämie litt (Tsuchiya *et al.*, 1980). Es handelt sich um eine immortalisierte Ziellinie. Durch Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) differenzieren diese Suspensions-Zellen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen und werden adhärent (Auwerx, 1991). Während bei Makrophagen, die aus Vollblut isoliert wurden, die Differenzierung der Zellen sehr detailliert geklärt ist, ist die PMA-vermittelte Differenzierung nicht im Detail charakterisiert (Daigneault *et al.*, 2010). Durch ihre einfache Kultivierbarkeit und Induzierbarkeit eignen sich die THP-1 für initiale Studien zum Einfluss einer VWF-Präinkubation der Pneumokokken auf die Phagozytose.

Zur Kultivierung wurden tiefgefrorene THP-1 Zellen bei 37°C aufgetaut und anschließend in eine 75cm² Zellkulturflasche mit vorgewärmten RPMI (RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin (VWR®)) mit 10% FCS (Kultivierungsmedium) bei 37°C und 5% CO² kultiviert. Da es sich bei THP-1 Zellen um eine immortalisierte Zell-Linie handelt, wurde die Zellen bis zur 20 Passage verwendet. Wenn die Zellsuspension nach 3-4 Tagen konfluent bewachsen war, konnte diese für Experimente ausdifferenziert oder aufgeteilt werden. Nach etwa 7 Tagen gingen die Zellen in ein exponentielles Wachstum über und konnten ab diesem Zeitpunkt für Experimente verwendet werden. Zu Versuchszwecken wurde der Inhalt einer 75cm² Zellkulturflasche mit ca. 5×10^5 Zellen/mL in ein 50 mL Schraubdeckel-Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden bei 100xg für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Sediment in 1 mL Kultivierungsmedium resuspendiert. Die Zellzahl konnte anschließend in einer 1:10 Verdünnung in einer Neubauer Zählkammer mit dem Lichtmikroskop bestimmt werden. Ab einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ THP-1-Zellen/mL wurden die Zellsuspension auf zwei 75cm²-Zellkulturflaschen mit 15 mL vorgewärmtem RPMI-Medium aufgeteilt.

3.5.3. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen erfordern eine schonende Kryokonservierung und Reaktivierung, so dass i.d.R. anstelle des Trypsins ein milder Protease-Mix (Accutase, eBioscience®) zur Ablösung verwendet wurde. Die bis kurz vor dem Erreichen der Konfluenz kultivierten HUVECs wurden

zunächst mit PBS gespült und anschließend mit ECGM von der Zellkulturflasche abgelöst. Nach Sedimentation der Zellen bei 220xg bei R.T. für 3 min wurden die Zellen in 1 mL 37°C vorgewärmtes Kryokonservierungsmedium aufgenommen. Die THP-1 Zellen wurden bei 100xg für 5 min zentrifugiert, um sie zu sedimentieren und in Kryokonservierungsmedium aufzunehmen.

Die Zusammensetzung des Konservierungsmediums richtet sich nach den Kulturansprüchen der einzelnen Zelltypen. Daher wurde für die primären ECGM (PromoCell) verwendet und auf 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) ergänzt. Für die THP-1-Zellen wurde RPMI (RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin (VWR®)) mit 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid eingesetzt.

Die Zugabe des DMSO (Roth) dient zum Schutz der Zellen vor Eiskristallbildung. Vor einer dauerhaften Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Kryoröhrchen im Verlauf von 24 h durch Lagerung bei -80°C in einem Isopropanol-gefüllten Gefäß (Mr. Frosty, Nalgene) langsam in 1°C/min- Schritten auf diese Temperatur gekühlt.

3.5.4. Untersuchungen zur Pneumokokken-Phagozytose durch THP-1 Zellen

Für die Phagozytose Analysen wurden die THP-1 Zellen wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben kultiviert. Nach einer Kultivierungszeit von mindestens 7 Tagen wurden 15 mL der THP-1 Zellen aus der Zellkulturflasche mit einer Einwegpipette steril entnommen und bei 100 für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde ab dekantiert und das Sediment in 1 mL Kultivierungsmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde zunächst in einer 1:10 Verdünnung in einer Neubauer Zählkammer mit dem Lichtmikroskop ausgezählt und die für den Phagozytose-Versuch gewünschte Zellzahl von 4×10^5 Zellen/mL eingestellt. Außerdem wurde eine Endkonzentration von 100 nM PMA hinzugegeben und so die Differenzierung zu Phagozyten-ähnlichen Zellen induziert. Anschließend wurden die Zellen in eine 24-Well-Platte (Sarstedt) ausgesät und für 48h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Ausbildung eines adhärenenten Phänotyps dient als Merkmal einer gelungenen Differenzierung der THP-1 Zellen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen mit ausgereifter Phagozytose-Aktivität. Nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen wurde die Phagozytose-Rate der Pneumokokken auf zwei verschiedenen experimentellen Varianten analysiert.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der VWF-Bindung an Pneumokoken auf die Phagozytose-Rate der Bakterien durch THP-1 Zellen festgestellt werden. Hierzu wurden die Phagozyten mit Pneumokokken, die mit 3 µg/mL VWF präinkubiert worden waren (Kapitel 3.2.4) in zwei unterschiedlichen Ansätzen inkubiert. Bei Variante A wurde die Anzahl der phagozytierten Bakterien durch Ausplattieren und Bestimmung der KBE quantifiziert. Die Auswertungsmethode wurde durch eine visuelle Beurteilung ergänzt, bei der nach Differenzielle Immunfluoreszenz-Färbung (DIF) eine mikroskopische Auswertung durchgeführt wird. Diese als Variante B-bezeichnete Auswertungsmethode ermöglicht eine direkte Visualisierung der Anzahl phagozytierter Bakterien im Verhältnis zu externen Bakterien, die an THP-1 Zellen assoziiert vorliegen. Zudem ermöglicht diese Variante eine morphologische Kontrolle der THP-1 Zellen im Verlauf des Infektionsversuches. Die Durchführung der beiden Varianten ist im Folgenden beschrieben.

Am Tag der Infektion wurden die differenzierten, nun adhärenenten THP-1 Makrophagen dreimal mit je 300 µL RPMI 1640 Medium mit 1% FCS (Infektionsmedium) gewaschen, um nicht-differenzierte und abgestorbene Zellen zu entfernen. Das Infektionsmedium enthielt 1% FCS, damit eine Interaktion des VWF mit extrazellulären Matrixkomponenten aus dem FCS zu vernachlässigen war. Vor Infektionsstart wurden die THP-1 Makrophagen in 300 µL desselben Mediums 1 h bei 37°C und 5% CO₂ ruhen gelassen. Die Ruhephase diente zur Erhöhung der Vitalität der Zellen. Das Infektionsvolumen von 300 µL wurde so gering gewählt, um die Bakterienkonzentration zu erhöhen und weitere Stressbelastung durch einen erneuten Zentrifugationsschritt zu vermeiden.

Die THP-1 Zellen wurden jeweils mit einem 50-fachen an Bakterien für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ in 24-Well-Platte inkubiert. Dafür wurde eine Suspension von *S. pneumoniae* und von *E. coli* K12 auf eine KBE von 2×10^8 /mL in Infektionsmedium eingestellt. Zur Überprüfung der zur Infektion eingesetzten Bakterienanzahl erfolgte die Plattierung von jeweils 5 µL Aliquots der Infektionssuspension in einer seriellen 1:10 Verdünnungsreihe mit PBS auf THY-Festmedium für *S. pneumoniae* oder auf LB-Festmedium für *E. coli* K 12. Nach einer Kultivierung für 1-2 Tage bei 37°C und 5% CO₂, wurde die jeweilige KBE bestimmt.

Im Anschluss an eine zweistündige Infektion der THP-1 Zellen mit den Bakterien wurden die Zellen sechsmal mit je 300 µL Infektionsmedium gewaschen. Ab diesem Versuchsschritt unterscheidet sich die Durchführung der beiden Analysevarianten des Phagozytose-Assay.

Versuchsvariante A: Diese Variante dient der Feststellung der Anzahl phagozytierter Bakterien und erfordert daher zunächst das Antibiotika-vermittelte Abtöten und anschließende Entfernen der an THP-1 Zellen assoziierten Bakterien. Dazu wurden nach dem zuvor beschriebenen Waschschrift 500 µL Infektionsmedium mit 200 µg/mL Gentamicin und 100 µg/mL Penicillin G zu den infizierten Zellen gegeben und dieses für eine weitere Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Penicillin G wirkt hemmend auf die bakterielle Zellwandsynthese; Gentamicin hemmt die Proteinbiosynthese (Munk, 2008). Nach der Antibiotika-Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit 500 µL PBS gewaschen, um die Antibiotika zu entfernen. Zur Kontrolle der Effizienz der Antibiotika-Behandlung wurde ein Teil des zuletzt ausgetauschten Waschpuffers ausplattiert und zur Bestimmung der KBE bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die infizierten Zellen wurden durch Inkubation mit 500 µL 0.1% Triton in PBS lysiert. Zur Bestimmung der Anzahl phagozytierter Bakterien anhand der KBE wurden in serielle 1:10 Verdünnungen der Zell-Lysate hergestellt und auf THY- bzw. LB-Festmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Versuchsvariante A wurde zusätzlich zu der oben beschriebenen Inkubation mit Pneumokokken mit und ohne Präinkubation mit 3 µg/mL VWF auch mit *E. coli* K 12 durchgeführt und die Phagozytose-Rate bestimmt. Diese diente anschließend als Vergleich der einzelnen Phagozytose-Analysen untereinander, um eine Standardisierung der Phagozytose-Rate und somit eine Vergleichbarkeit der Effizienz der einzelnen Versuche zu ermöglichen.

Versuchsvariante B: Diese Variante dient der Vorbereitung der THP-1 Infektionsproben für die Immunfluoreszenz-Analyse. Nach Beendigung der Infektions-Zeit erfolgte zur Entfernung ungebundener Bakterien ein Medium-Austausch und eine weitere Inkubation für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ in 500 µL Infektionsmedium. Danach wurden die Zellen dreimal mit 500 µL PBS gewaschen und mit 500 µL 3% PFA in PBS fixiert. Die fixierten Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Es folgte eine DIF wie in Abschnitt 3.5.7 beschrieben.

3.5.5. Zellkulturinfektions-Analysen mit humanem Endothel

In diesen Versuchen sollte der Einfluss von VWF auf die bakterielle Adhäsion und die Internalisierung der Pneumokokken in humane Zellen beurteilt werden. Die Durchführung der Infektionsanalysen erfolgte nach einem standardisierten Protokoll. Hierbei erfolgte entweder eine Vorinkubation HUVECs oder der Bakterien mit VWF. In Vorbereitung für Infektions-Versuche wurden HUVECs wie unter 3.5.1 beschrieben aus der Kryokonservierung kultiviert, von der Zellkulturflasche mit Accutase abgelöst und nach Bestimmung der Zellzahl mittels der

Neubauer-Zählkammer in eine 24-Well-Platte (Sarstedt) ausgesät. Die 24-Well-Vertiefungen enthielten sterile Deckgläser für die spätere Differenzielle Immunfluoreszenz-Färbung (DIF). Nach der Aussaat von 2×10^5 Zellen pro Vertiefung in 1 mL ECGM (PromoCell) erfolgte die Kultivierung bis zum Erreichen einer Subkonfluenz bei 37°C und 5% CO₂. Die zu testenden Pneumokokken-Stämme wurden wie unter 3.2.1 beschrieben kultiviert und ggf. mit human VWF präinkubiert (siehe 3.2.4). Für die Infektion wurde photometrisch eine KBE von $1,2 \times 10^8$ Bakterien/mL eingestellt. Dies entspricht 10-fachen der Menge an Bakterien im Vergleich zur Zellzahl. Die Inkubation der Endothelzellen mit Pneumokokken erfolgte nach dem Waschen der Zellen mit 37°C-temperiertem PBS in 500 µL Endothelial Cell Basal Medium (ECBM, PromoCell) ohne FCS-Zusatz, um mögliche Bindungsinhibitionen durch Serumkomponenten im FCS zu vermeiden. Die weiterführende Bestimmung der bakteriellen Adhärenz und Internalisierung erfolgte nach dem gleichen Protokoll, wie für die THP-1 Zellen. Um die konzentrationsabhängige Wirkung des VWF auf die Adhäsion der Pneumokokken und die bakterielle Internalisierung zu untersuchen, wurden die Endothelzellen, bzw. die Pneumokokken vor der Infektion für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ mit steigenden VWF-Konzentrationen präinkubiert (0,1 µg, 1 µg und 10 µg VWF sowie 3 µg). Nach der Präinkubation erfolgte ein Mediumaustausch und die Infektion mit Pneumokokken wie oben beschrieben. Als Negativkontrolle wurde die Infektion der Endothelzellen ohne VWF-Vorinkubation durchgeführt. Bei jedem der Infektionsanalysen erfolgte während des Versuches eine mikroskopische Kontrolle der Zellvitalität und Morphologie. Sämtliche Infektionsanalysen wurden mindestens in zwei unabhängigen Versuchen mit technischen Duplikaten durchgeführt.

3.5.6. Durchführung von Zellkultur-Infektionsanalyse in HUVECs mit VWF-Bindungsmodulatoren

Neben den Infektionsversuchen unter Zugabe von humanem VWF wurden auch verschiedene kompetitive Inhibitionsanalysen mit Bindungsmodulatoren durchgeführt, die entweder zusammen mit VWF zu den Endothelzellen gegeben wurden oder aber zusammen mit VWF zur Präinkubation der Pneumokokken eingesetzt worden sind. Folgende Modulatoren wurden zur Inhibitionsanalysen zu den humanen Endothelzellen gegeben: Histamin, das RGD-Peptid, das RGE-Peptid, N-Acetylcystein sowie Heparin in zwei verschiedene Konzentrationen. Einige potenzielle Modulatoren wurden zur Präinkubation der Pneumokokken eingesetzt: N-Acetylcystein, zwei verschiedene Heparin Konzentrationen, das Enolase-Peptidsequenzen-Motif Nr. 3 mit der potenzieller VWF-Bindungsstelle („short peptide“, „long peptide“), sowie

eine Enolase-Peptidsequenz mit bekannter Plasminogen-Bindungsstelle. Die Inkubation der Zellen mit dem VWF-Sekretions-Induktor Histamin sollte den Einfluss der endogenen VWF-Produktion und Sekretion auf die VWF-vermittelte Bakterienadhärenz aufzeigen. Demgegenüber sollten durch die Inkubation mit Heparin und mit N-Acetylcystein mögliche inhibitorische Bindungseffekte von exogen zugesetztem VWF nachgewiesen werden. Für die VWF-Inkubation der Endothelzellen wurden jeweils 3 µg/mL humanes VWF Protein verwendet. Die einzelnen Bindungsmodulatoren wurden für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ in 500 µL ECBM mit den Endothelzellen inkubiert. Die jeweilige zu den Analysen eingesetzten Modulatorkonzentrationen sind der aus Tabelle 3-14 zu entnehmen. Nach Ablauf der Inkubation der Zellen mit den Modulatoren wurde mit 500 µL ECBM Medium ein Mediaustausch vorgenommen. Die anschließende Infektion erfolgte für insgesamt 4 h mit 6 x 10⁶ Pneumokokken in 500 µL ECBM Medium wie unter 3.5.5 beschrieben. Die tatsächlich eingesetzte Bakterienmenge wurde durch Kontrollplattierung der Bakteriensuspension überprüft.

Die Inhibitions-Analysen wurden ergänzend nach Präinkubation der Pneumokokken mit Heparin und N-Acetylcystein und auch nach Präinkubation mit drei spezifischen Peptiden durchgeführt. Zwei dieser Peptide enthielten das im Rahmen dieser Arbeit postulierte VWF-Interaktionsmotif der Eno repräsentiert durch das „long peptide“ mit 24 Aminosäuren (A-L-R-Y-G-A-E-I-F-H-A-L-K-K-I-L-K-S-R-G-L-E-T-A) und „short Peptide“ mit 15 Aminosäuren (A-L-R-Y-G-A-E-I-F-H-A-L-K-K-I). Zusätzlich erfolgte durch Präinkubation der Pneumokokken auch die Überprüfung möglicher inhibitorischen Effektes durch Zugabe eines Peptides, das die Plasminogenbindungssequenz der Eno enthält („FYDKERKQYDT“, Bergmann *et al.*, 2003). Die Präinkubation der Bakterien erfolgte analog zur VWF Präinkubation (3.2.4). Die eingesetzten Modulatoren sind in Tabelle 3-14 aufgeführt.

Tabelle 3-14: Konzentrationen der Bindungsmodulatoren in den Inhibitionsanalysen

Inhibitions- /Bindungskomponente	Konzentration/mL (HUVEC-Inkubation)	Konzentration/mL (Pneumokokken- Inkubation)
Histamin	5 x 10 ⁻⁵ mM	-
Heparin	120 IU	120 IU

Heparin	30 IU	30 IU
N-Acetylcystein	200 μ M	200 μ M
RGD-Peptid	5 μ g	-
RGE-Peptid	5 μ g	-
„short peptide“	-	5 μ g
„long peptide“	-	5 μ g
Plasminogenbindungs-Peptid	-	5 μ g

Nach der Präinkubation wurde die Bakterienmenge erneut photometrisch bestimmt. Die anschließende Infektion erfolgte für insgesamt 4 h mit 6×10^6 Pneumokokken in 500 μ L ECBM Medium wie unter 3.5.5 beschrieben. Anhand der KBE-Bestimmung der eingesetzten Bakteriensuspension wurde die tatsächlich zu Infektionsbeginn vorhandene Bakterienzahl bestimmt. Zur Negativkontrolle erfolgte die Infektion der Zellen ohne Präinkubation. Zudem wurden Infektionen mit Bakterien durchgeführt, die mit den Modulatoren, aber nicht mit VWF präinkubiert worden sind. Um inhibitorische Effekte der Modulatoren auf die Teilungsfähigkeit der Bakterien auszuschließen erfolgte die Analyse der Bakterienvermehrung über die Zeit. Die Auswertung der Inhibitionsanalysen erfolgte durch fluoreszenzmikroskopische Visualisierung und Quantifizierung nach der DIF (siehe 3.5.7).

3.5.7. Differenzielle Immunfluoreszenz-Färbung (DIF)

Zur mikroskopischen Unterscheidung von adhären, extrazellulären und intrazellulären Pneumokokken wurden die Bakterien im Rahmen einer Differenzielle Immunfluoreszenz-Färbung (DIF) mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Zur Immunfluoreszenz-Färbung wurden Pneumokokken-spezifische Antikörper verwendet, die nach Immunisierung von Kaninchen mit hitzeinaktivierten Bakterien aus dem Serum gewonnen wurden. Die Verwendung von zwei verschiedenen Kaninchen-spezifischen Antikörpern mit unterschiedlichem Fluorophor-Konjugaten bei Emissionswellenlängen von 488 nm und 568 nm ermöglicht eine spezifische differenzielle Pneumokokken-Detektion auf der Zelloberfläche in Gelb bei einer Überlagerung und nach Zellpermeabilisation innerhalb der Zelle in Rot. Die Immunfluoreszenz-Färbung der fixierten Zellen erfolgte bei R.T. in 120cm² großen

Inkubations-Dunkelkammern, die mit PBS-getränkten Whatman-Filterpapier und Parafilm als Auflagefläche für die Deckgläschen. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde jedes der Deckgläschen mit PBS gewaschen und in 50 µL Blockierungslösung (5% BSA in PBS) für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 µL eines Pneumokokken-spezifischen Antikörpers aus Kaninchen (Verdünnungsfaktor 1:100) für 30 min. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Deckgläschen in 50 µL des grün fluoreszierenden anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 aus Ziege (Verdünnungsfaktor 1:100) gelegt und für weitere 30 min inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt sollten die adhärenenten Pneumokokken grün fluoreszieren. Nach weiteren Waschschritten wurde die Membran der humanen Zellen in 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) für maximal drei Minuten permeabilisiert und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte erneut eine Inkubation mit 50 µL des Pneumokokken-spezifischen Antikörpers (Verdünnungsfaktor 1:100) für 30 min, der durch die vorhergehende Permeabilisierung nun auch die internalisierten Bakterien detektieren kann. Im nächsten Schritt wurden die Deckgläschen mit rot-fluoreszierenden anti-Kaninchen Alexa 568-Antikörper für 30 min inkubiert (Verdünnungsfaktor 1:100). Als letztes wurden unter anderem die THP-1 Zellen für 30 min mit Alexa 350- konjugiertem Phalloidin inkubiert. Dieser Toxin-gekoppelte Farbstoff markiert selektiv das F-Actin des zellulären Zytoskeletts (Verdünnungsfaktor 1:1.000). Durch diese Reihenfolge der Färbung sollten die adhärenenten Pneumokokken durch die Überlagerung der Zweitantikörper in Gelb, die internalisierten Pneumokokken in Rot und das Actin-Zytoskelett in Blau gefärbt werden. Die erneut gewaschen Deckgläschen wurden auf Objektträgern mit Einbettungsmedium (Fluorescence Mounting Medium, Dako) fixiert und bei 4°C gelagert. Für die Auswertung wurde nach einer ersten Übersicht im Regelfall von repräsentativen Bildausschnitten 50 Zellen ausgewertet. Eine Auswertung der am Mikroskop ausgezählten Zellen erfolgte in Excel. Die Bearbeitung erfolgte in PowerPoint oder mit dem Microsoft Office Picture Manager. Die statistische Signifikanzbewertung wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's *t*-Test mit einem *P*-Wert < 0,05 in Excel durchgeführt.

3.5.8. Zellkulturanalysen nach definierter Flusskultivierung

Um die Wechselwirkungen zwischen Pneumokokken, human VWF und dem Endothel unter möglichst physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, wurde die Zellkultivierung in einem Flusskultivierungssystem der Firma ibidi® etabliert. Dieses System ermöglicht die Kultivierung von Endothelzellen unter konstanten oder gepulstem Scherstress und die

Simulation sämtlicher Flussparameter in unterschiedlichen Gefäßen des Blutsystems. Das Flusssystem besteht aus einer Pumpe, einer Flusseinheit mit zwei Flüssigkeitsreservoirien, dem Microslide und einem EDV-System mit spezieller Pumpsoftware (Pump Control, Version 1.5.2). Die Flusskultivierung erfordert eine stabile Zellvitalität und eine stets nur zur Subkonfluenz kultivierten HUVEC-Kultur bis zur maximalen Passage 5. Die Kultivierung erfolgt wie unter Punkt 3.5.1 beschrieben. Sämtliche Versuchsmaterialien und Kultivierungsmedien wurden vor der Flusskultivierung für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ äquilibriert, um die Entwicklung von Luftblasen zu minimieren. Durch Erhöhung der FCS-Konzentration im Flusskulturmedium auf 5% und Zugabe von 1 mM Mg₂SO₄ zum Kultivierungsmedium (ECGM Medium, Promo Cell) wurde die Proliferationsrate der HUVECs und die Stabilität der Zell-Zell-Kontakte erhöht. Zur Zell-Aussaat wurden spezielle, für die Flusskultivierung angefertigte Objektträger (Luer-Slides) für 1 h bei R.T. mit 120 µL einer 2% (w/v) sterilen Gelatine-Lösung in ddH₂O (Roth) im Slide inkubiert. Nach der Kulturvorbereitung der HUVECs wie unter 3.5.1 beschrieben, wurden 1 x 10⁶ Zellen in 250 µL Flusskulturmedium in 0.4 Luer Slides (ibidi®) ausgesät mit einer 1 mL Luer-Spritze. Direkt vor der Zellaussaat wird das beschichtete Slide mit 1 mL sterilfiltriertem PBS gespült. Das Slide wurde nach der Aussaat für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ stehend inkubiert, um die Anheftung der HUVECs zu ermöglichen. Nach der Hälfte der Zeit erfolgte die Zugabe von insgesamt 120 µL Flusskultivierungsmedium in die Reservoirie.

Vor Beginn der eigentlichen Flusskultivierung erfolgte die Montage der desinfizierten und äquilibrierten Systemkomponenten unter sterilen Bedingungen nach Angaben des Herstellers. Die Flusskultivierung sollte bei einer Scherkraft zwischen 3 und 10 dyn/cm² erfolgen und wurde aufgrund der benötigten Schlauch-Länge für die Echtzeit-Mikroskopie mit einem 50 cm langen Perfusion Set mit einem Innendurchmesser von 1.6 mm durchgeführt (gelb/grünes Perfusionsset, ibidi®). Zunächst wurde der Medium-Strom ohne Slide-Anschluss im geschlossenen System getestet. Das zur Steuerung der Flusskultivierung zu nutzende Softwareprogramm ermöglicht die Eingabe sämtlicher Flussparameter wie z.B. Pumpendruck, Flussgeschwindigkeit, Größe des Luer-Slides, Angabe des verwendeten Schlauchsystems und Viskosität des Flusskultivierungsmediums. Da die Experimente mit wässrigem Kulturmedium durchgeführt worden sind, wurde eine Viskosität von 0,007 dyn*s/cm² eingestellt. Das System wurde bei einem Druck von 40 mbar gestartet, um die Luftblasen im Schlauchsystem zu entfernen und durch mehrmaliges Messen der Zeitdauer, in der 2 mL Medium aus den Reservoirien geflossen sind wurde über den "Recalibrationfaktor" in der Software der ermittelte

Durchschnittswert für die Flussrate pro mL eingegeben. Nach dieser Systemadaption wurde das vorkultivierte Luer-Slide mit der Flusseinheit wie in Abbildung 3-1 dargestellt verbunden.

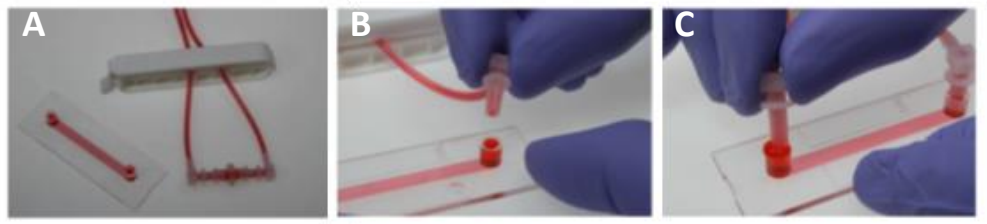


Abbildung 3-1: Anschluss des Luer-Slides an die Flusskultivierungseinheit

In (A) ist das Abklemmen des Schlauchsystems dargestellt zur Vermeidung von Lufteinschlüssen. (B) und (C) zeigen den Anschluss des Slides an das Schlauchsystem.

Im Software-Programm zur Pumpensteuerung wurde das entsprechende Luer-Slide ausgewählt und die Flussparameter neu eingestellt. Die Kultivierung erfolgte zunächst für 30 min bei einem Scherstress von 5 dyn/cm². Danach wurde die Scherstressrate auf 10 dyn/cm² erhöht und die Zeitbegrenzung inaktiviert. Zur Nährstoffversorgung der Zellen erfolgte täglich ein Austausch von 10 mL Flussmedium.

3.5.9. Infektionsanalysen unter Fluss-Bedingungen

Die Infektionsanalyse im Mikrofluidik-System der Firma ibidi® ermöglicht eine mikroskopische Echtzeit-Visualisierung von Scherstress-abhängigen Interaktionen zwischen den Pneumokokken und der differenzierten Endothelzelloberfläche. Zur Echtzeit Mikroskopie des Mikrofluidik-Systems wurde die Mikroskop-Inkubationskammer auf 37°C temperiert und ein Hybridisierungssofen für die Temperierung der Flusseinheit unter Berücksichtigung der Perfusionsschläuche umgebaut. Die Flusseinheit konnte nach intensivem Spülen mit Isopropanol und ddH₂O mehrmals für Infektionsanalysen verwendet werden. Zudem wurden die Filter der Reservoirs entsprechend ausgewechselt.

Zur Infektionsanalyse im Flusssystem erfolgte die Zugabe von RFP-exprimierenden Pneumokokken des Serotyps 35A (PM40, Tabelle 3-2), der sich aufgrund der geringen Polysaccharidkapsel bereits zur Durchführung von statischen Zellkulturanalysen bewährt hat (Bergmann *et al.*, 2009). Des Weiteren wurden hitzeinaktivierte PM40-Bakterien eingesetzt (siehe 3.2.3). Nach der standardisierten Kultivierung wurden die Bakterien bei 1.000xg für 10 min sedimentiert und in 1 mL 0.1 M Natrium-Carbonatpuffer resuspendiert.

Bei einigen Fragestellungen erfolgte zur Stimulation der VWF-Sekretion aus WPB die Zugabe von 83 ng/mL einer auf 37°C temperierten 100 mM Histaminlösung in die Flussreservoirs. Durch die Scherkrafteinwirkung sollte das VWF-Protein im Fluss zu großen Proteinkomplexen multimerisieren, die im Mediumstrom lange VWF-Fäden ausbilden. Zur Visualisierung dieser VWF-Proteinfäden wurde eine 1:200 Verdünnung eines VWF-spezifischen und FITC-konjugierten polyklonalen Antikörpers über die Reservoirs in das zirkulierende Flusssystem gegeben. Nach 5-minütiger Antikörperzirkulation wurde die Infektion durch Zugabe von 2×10^9 Bakterien zum Flusskulturmedium gestartet. Während einer zweistündigen Infektion erfolgte immer wieder die Echtzeit mikroskopische Visualisierung. Der Fokus der Analyse lag hierbei zum einen auf der Darstellung von bakteriellen Anheftungsprozessen, zum anderen auf Hinweisen zur morphologischen Veränderung der Zellen und strukturellen Effekten des VWF-Proteins. Zusätzlich wurden die Zellen am Ende des Versuchs durch einen Austausch von 10 mL Flusskulturmedium mit dem gleichen Volumen 5% PFA (v/v) und 0.1% (v/v) Glutaraldehyd in sterilfiltriertem PBS für 10 min bei 10 dyn/cm² fixiert.

Die Infektionsanalysen im Mikrofluidiksystem wurden auch ohne vorherige Histamin-Stimulation der VWF-Sekretion durchgeführt um festzustellen, ob die Pneumokokken-Adhärenz an die HUVEC bzw. die Wirkung des zytotoxischen Pneumolysins bereits ausreichen, um die WPB-Exozytose nachweislich zu induzieren. In Inhibitionsanalysen wurde zudem die Auswirkungen auf die VWF-vermittelten Pneumokokken-Adhärenz bei zusätzlicher Zirkulation von 30 IU/mL Heparin untersucht. Dabei wurden die entsprechenden Objekte, wie RFP-Pneumokokken, Endothelzellen, globulärer- oder filamentöser-VWF gezählt. Ab einer Länge von 3 µm wurde ein VWF-Signal als VWF-Faden gezählt (Schneider *et al.*, 2007). Darunter wurde die durch den anti-VWF-Antikörper gefärbte Strukturen als globulären VWF gewertet. Alle Analysen basieren auf drei voneinander unabhängigen Versuchen. Alle Daten sind als mit Standardabweichungen der drei Versuche dargestellt. Statistisch signifikante Ereignisse wurden in Excel mit einem ungepaarten Student's *t*-Test ermittelt mit einem *P*-Wert von < 0.05.

3.6. Das Zebrafisch *in vivo* Hämostase-Modell

Das *in vivo* Modell des Zebrafischs wurde zur Analyse der Interaktion zwischen Pneumokokken und VWF im Blutstrom eines lebenden Organismus genutzt. Die Verwendung des Zebrafisch-Modells erfolgte in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Reinhard W. Köster am

Institut für Zoologie der TU Braunschweig, in der routinemäßig die Zebrafisch-Anzucht stattfindet. Die Arbeitsgruppe stellte ihre langjährige Erfahrung und sämtliche technische Ausrüstung für dieses Projekt zur Verfügung.

3.6.1. Verwendete Zebrafisch-Stämme und Anzucht der Zebrafisch-Larven

In dieser Arbeit wurden sowohl Wildtyp-Fische der Line WT Brassi PBS 0545 verwendet, sowie die transgene Fischlinie TgCflk1:mcherryCAAX mit einem durch das Fluorophor mCherri rot fluoreszierendem Endothelmarker. Die Fluoreszenz des Endothels ermöglicht die Visualisierung des Blutgefäßsystems der transgenen Fischlarven am Fluoreszenzmikroskop und erleichtert die Detektion der Zielstrukturen in Echtzeit im lebenden System. Die aus der Anpaarung resultierenden Wildtyp Larven und die homozygoten Larven der transgenen Linie wurden in den Interaktions- und Infektionsanalysen in einem Alter von 5 Tagen nach Fertilisation (5 dpf) verwendet. Die Zebrafische wurden in Gruppen von 20–40 Individuen gehalten in Fischtanksystemen (Aquaneering, San Diego, CA), welche eine Leitfähigkeit von um die 700 mS gewährleisten und einen pH zwischen 6,9 und 7,1 bei 28°C. Es besteht ein Tag/Nacht-Zyklus von 14/10 h nach den anerkannten Zebrafisch Haltungsrichtlinien (Westerfield, 2007). Zur Paarung der Zebrafische wurden die Elterntiere zusammengebracht und bei Beginn des nächsten Tageszyklus durch entfernen des Trennschiebers das Ableichen für 5 h ermöglicht. Die befruchteten Eier wurden gesiebt, mit Eiwasser (VE-Wasser mit 40 g Instant Ozean Seesalz, Aquarium Systems) gespült und in einer Petrischale mit 30% (v/v) Danieau-Medium für 5 Tage bei 28°C inkubiert. Hierbei erfolgte ein täglicher Wechsel des Danieau-Mediums.

3.6.2. Durchführung der Interaktion- und Infektionsstudien im Zebrafisch-Modell

In mehreren vorgeschalteten Testläufen wurden zunächst sämtliche Versuchsparameter optimiert, die zur Injektion von Pneumokokken in das Blutgefäßsystem der lebenden Zebrafischlarven wichtig sind. Dazu wurden verschiedene Betäubungsmittelkonzentrationen appliziert, unterschiedliche Injektionsstellen an der Larve vergleichend ausgetestet, die technischen Injektionsparameter optimiert, die Immunfluoreszenz-Färbungen adaptiert und Mikroskopie Einstellungen variiert. Im Folgenden ist beschrieben, wie und bei welchen optimalen Parametern die Pneumokokkeninfektionen durchgeführt worden sind.

Die Interaktions- und Infektionsstudien erfolgten mit einer Gruppengröße von mindestens 12 Larven im Alter von 5 Tagen, die zunächst mit 0,02% Tricaine (Ethyl-3-aminobenzoat-methanesulfon Säure, Sigma Aldrich) in 30% (v/v) Danieau für 3-5 min sediert wurden. Die Larven wurden unter mikroskopischer Kontrolle (Leica KC 200 LED) in 1% Prozent 400 µL Agarose in PBS (Ultra Low gelling Agarose, Type IX-A, Sigma-Aldrich) in einer speziellen für die Mikroskopie ausgelegten Petrischale mit einem Durchmesser von 35 mm (ibidi®) in gerichteter Lage eingebettet, so dass die ventrale Seite mit der Herzregion in optimaler Injektionsposition vorlag. Die Injektion der Bakterien wurde mit speziellen Glaskapillaren (Harvard Apparatus, 30-0019 Capillaries) durchgeführt, die manuell mit Hilfe eines vertikalen Pipettenziehers (DKI Model 700c, David Kopf Instruments) zu Injektionsnadeln mit besonders feiner Spitze gezogen wurden und mit einer feinen Pinzette geöffnet wurden.

Um eine schnelle Verteilung der Pneumokokken im Blutsystem der Larven zu gewährleisten wurde eine direkte Injektion der Pneumokokken in die Herzkammer der betäubten und in Agarose-eingebetteten Zebrafärblingen vorgenommen. Zum einen sollte hierbei während einer zweistündigen Infektion die Pneumokokken-Zirkulation und Anheftung in den Blutgefäßen mikroskopisch visualisiert und dokumentiert werden. Zum anderen sollte beurteilt werden, ob die Bakterien mit endogenem VWF des Zebrafischs interagieren und koloalisieren und wie sich eine Präinkubation der Bakterien mit humanem VWF auf die Endotheladhärenz in den Larven und deren Überlebensrate auswirkt.

Die Vorbereitung der Bakterienkultur und die Präinkubation mit humanen Plasma-VWF erfolgte in standardisierter Weise wie in dem Kapitel 3.2.1 und 3.2.4 beschrieben. Zur Präinkubation wurden in diesem Versuch 10 µg/mL VWF verwendet und mit 3×10^9 Bakterien inkubiert. Die Bakterien wurden nach abschließender Sedimentation bei 1.000 x g und R.T. für 10 min in 50 µL steriltfiltriertem PBS resuspendiert und mit 5 µL PhEnolrotlösung (Applichem) vermischt, um die Injektionseffizienz visuell sicherstellen zu können. Zur Kontrolle des Injektions-Inokulums wurde ein Aliquot der Bakteriensuspension zur Bestimmung der KBE in serieller 1:10 Verdünnung auf CNA-Festmedium ausplattiert. Zur Injektion in die Herzkammer der Larven wurden je 5 µL der Suspension mit einem Eppendorf microloader™ in die Injektionsnadel pipettiert und mit einem speziellen Injektor (FemtoJet 4i device, Eppendorf) bei 150 hPa Injektionsdruck, 50 hPa Kompressionsdruck dreimal im 0,5 s Intervall in das Gewebe injiziert. Anschließend wurde das Sedativum durch Austausch mit 30% Danieau-Lösung ersetzt und die Blutzirkulation der Larven für 2 h bis maximal 18 h mikroskopisch analysiert. Zuletzt erfolgte die Beurteilung der Überlebensdauer der Larven. Nach den

jeweiligen Zeitpunkten erfolgte eine Fixierung der Larven in 4% PFA in PBS gefolgt von der DIF. Zur längerfristigen Lagerung können die Larven bei -20°C bis zu 2 Monate in 100% MeOH aufbewahrt werden.

Der Kaplan-Meier-Plot für die Überlebenskurve, sowie die statistische Auswertung für das 18 h Überlebens-Experiment und der Student's *t*-Test wurde mit der Software Graphpad Prism 7 durchgeführt. Dabei erfolgte das Überlebens-Experiment einmalig mit 50 Larven je Bedingung und 15 Larven als Kontroll-Larven für die Injektion von Phenolrot, um die Kontrolle-Sterblichkeit zu ermitteln. Die Bearbeitung der aus der LasX-Software exportierten jpg-Dateien für die Versuche über 2 h und 5 h wurde mit PowerPoint durchgeführt. Die Infektionen für 5 h wurden dabei initial für 20 Larven mit und ohne VWF-präinkubierten Pneumokokken durchgeführt. Die Infektion für 2 h wurde in zwei unabhängigen Versuchen mit mindestens 12 Larven pro Bedingung durchgeführt und mit repräsentativen Aufnahmen aus drei Larven dargestellt. Zudem wurde bei diesen Versuchen auch eine Gruppe von 10 Larven zur Beurteilung der Kontrolle-Sterblichkeit durch die Injektion von Phenolrot in PBS mitgeführt. Dabei überlebten alle Larven die Kontroll-Injektion bei den 2 h, 5h bis 18 h Versuchen. Die Auswertung der VWF-Kolokalisation, der FLIC-Adhäsionsaufnahmen und der 5 h Zeitwerte erfolgte durch fluoreszenzmikroskopische Visualisierung nach der DIF.

3.6.3. Immunfluoreszenz-Detektion der Pneumokokken und des VWF nach Infektion der Zebrafischlarven

Zusätzlich zur mikroskopischen *in vivo* Visualisierung der Anheftung der Pneumokokken an das Gefäßendothel ermöglichte die DIF eine simultane Detektion der Bakterien und des VWF im fixierten Larvengewebe. Nach dem Fixieren der Larven mit 4% PFA ü.N. bei 4°C wurden die Larven zunächst aus der Agarose freigelegt und in Gruppen von jeweils 10-12 Larven für 5 min bei RT in 1 mL PBS inkubiert. Die Permeabilisierung des Gewebes erfolgte für 7 min mit -20°C kaltem Aceton und anschließendem Waschen für jeweils 5 min mit dH₂O und PBS. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Larven für 1 h bei R.T. in einer PBS-Blockierungslösung, versetzt mit 2% (v/v) Ziegenserum (Thermo Fischer), 3% (w/v) BSA (Carl Roth) und 1% (v/v) DMSO (Roth) inkubiert. Zur VWF-Detektion erfolgte ü.N. durch die Inkubation der Larven mit einem FITC-konjugierten VWF-spezifischen Primär-Antikörper (10 mg/mL, Abcam) in einer 1:50 Verdünnung. Nach Entfernen ungebundener Antikörper durch zweistündiges Waschen mit Blockierungslösung wurden die Bakterien für 2 h bei R.T. mit einer 1:100-Verdünnung eines in Kaninchen generierten Pneumokokken-spezifischen Ig-

Antikörpers immunologisch markiert. Ein Alexa 568-konjugierter Sekundär-Antikörper (2 mg/mL, Invitrogen) wurde nach dem erneuten Waschen der Larven mit Blockierungslösung in einer 1:200-Verdünnung für weitere 2 h bei R.T. zur Detektion des Primär-Antikörpers zu den Larven gegeben. Nach dem letzten zweistündigen Waschschrift mit Blockierungslösung wurden die Larven in 1% Agarose (Ultra Low gelling Agarose, Type IX-A, Sigma-Aldrich) eingebettet und vor der mikroskopischen Analyse mit Fixierungslösung (4% PFA in PBS) überschichtet. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte wie unter Kapitel 3.6.4 beschrieben.

3.6.4. Fluoreszenzmikroskopie

Die gefärbten Präparate wurden mit dem konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop (Leica DMI8) mit einem 63-fachen-Öl-Immersions-Objektiv oder einem 20-fach-Wasser-Objektiv mikroskopiert. Die Fluoreszenzmikroskopie basiert auf der Anregung der an Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe mit einer bestimmten Wellenlänge. Dabei emittieren die angeregten Fluoreszenzfarbstoffe Licht einer größeren Wellenlänge, als das der Anregung. Die Visualisierung erfolgt mit Hilfe der Software LasX. Im Falle des konfokal-Modus rastert ein Lichtstrahl mit einer definierten Welllänge das Präparat ab und die emittierten Photonen des Farbstoffes werden durch einen Photomultiplier oder einen Hybrid-Detektor detektiert. Der bessere Kontrast wird durch eine Lochblende erreicht, die das Streulicht minimiert und die Tiefenschärfe erhöht.

Zur Visualisierung der Pneumokokken-Adhärenz in den statischen Zellkulturinfektions-Analysen, im Verlauf der Flusskultivierung und in den Zebrafischlarven wurde der Fluoreszenz-Modus verwendet, der eine schnellere Bildschärfenregulation ermöglicht als der konfokale-Modus. Für die Phagozytose-Studien wurde die Laser-Scanning-Funktion im konfokal-Modus genutzt. Die Mikroskopie erfolgte mit einem Öl-Immersionsobjektiv mit 63-facher Vergrößerung. Die 405 nm Laserdiode wurde für die Anregung des ALEXA 350 konjugierten Phalloidins mit einer Intensität von 0,3% verwendet. Die optisch gepumpten Halbleiterlaser (OPSL) für die Wellenlängen 488 nm und 552 nm wurde mit einer Intensität von jeweils 0,2% genutzt. Zur Dokumentation des Fluoreszenzergebnisses wurden Z-Stack-Überlagerungen repräsentativer Ausschnitte mit der Kamera aufgenommen und mit dem Programm LasX-Software visualisiert. Im Rahmen der Mikrofluidik-Analysen wurden Zeitreihen-Aufnahmen mit einem Bild pro 2 Minuten durchgeführt. Die Videos der Blutzirkulation im Zebrafisch wurden mit 4 Bildern/min aufgenommen. Die *in vivo*-Beobachtung der infizierten Zebrafischlarven erfolgte mit dem Wasser-Objektiv bei 20-facher

Vergrößerung (HC PL IRAPO 20 x /0.75) und mit dem Öl-Immersionsobjektiv bei 63-facher Vergrößerung (HC PL APO CS2 63 x /1.40) unter Nutzung der Fluoreszenzbeleuchtung. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer auf Xenon-Gas basierten Fluoreszenzbeleuchtung bei 30% Intensität durchgeführt. Die Auflösung der Zebrafischaufnahmen betrug 1392 x 1040 Pixel, die der Flusskultivierung 1118 x 838 Pixel und die der Zellkultur 1392 x 1040 Pixel.

Zur Beurteilung einer Kolo-kalisation von Pneumokokken und VWF auf Endotheloberflächen wurden nach Auswahl geeigneter Bildabschnitte Fluoreszenzhistogramme erstellt. Diese Histogramme bilden die Emissionsspektren der beiden verschiedenen Fluorophoren an den zuvor markierten Stellen im Mikroskopiebild ab. Die Überlagerung der Emissionsspektren des FITC-konjugierten anti-VWF-Antikörpers des RFP-exprimierenden Pneumokokken-Stammes führte an der gleichen Stelle bei beiden Fluorophoren zu einem Emissionspeak, so dass von einer räumliche Kolo-kalisation des VWF und des Bakteriums ausgegangen werden kann. Die Quantifizierung der Anzahl adhären-ter und internalisierter Bakterien erfolgte durch visuelle Zählung der Bakterien an 50-200 Zellen je Deckglas in repräsentativen Bereichen. Zur Bestimmung der VWF-Fadenbildung im Mikrofluidiksystem wurden jeweils nach 30, 60, 90 und 120 min Inkubationszeit von jeweils 30 repräsentativen Aufnahmen je Zeitwert mindestens 10 HUVECs pro Sichtfeld visuell ausgewertet. Die statistische Signifikanz der ermittelten Bakterienzahlen und der gezählten VWF-Fäden wurde durch die Berechnung mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's *t*-Test bewertet und bei P-Werten < 0,05 als statistisch signifikant bezeichnet. Mit den Softwareprogrammen PowerPoint (Microsoft) und Adobe Photoshop CS5 (Version 12.0.) wurden Helligkeit und Kontrast unter strikter Berücksichtigung der Regeln guten wissenschaftlichen Arbeitens angepasst, um die Bilddarstellung für Dokumentationszwecke auf Papier zu optimieren.

4 Ergebnisse

4.1. Untersuchung der Interaktion von Pneumokokken mit VWF zur Biochemie der Bindungen und Effekten in Zellkultur als auch im *In vivo* Model Zebrafisch

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Pneumokokken die Sekretion von humanen Von Willebrand Faktor (VWF) induzieren (Lüttge *et al.*, 2012). Ergänzend zeigten unveröffentlichte Dot-Spot-Overlay-Analysen, dass die Oberflächen-assoziierte

Pneumokokken Enolase (Eno) die Bindung an den VWF vermittelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte zuerst die biochemische Charakterisierung der Interaktion zwischen der rekombinant in *E. coli* produzierten und aufgereinigten Pneumokokken Eno mit VWF. Dieser erste Abschnitt umfasst die Dot-Spot-Overlay-Analysen, sowie die Ermittlung der an der Bindung beteiligten Peptide-Domänen und deren strukturelle Lokalisation im Eno-Oktamer.

Darauffolgend wurden die Bindungskinetik-Parameter mit MST und SPR ermittelt. Abschließend zur biochemischen Charakterisierung wurde der Bindungsbereich im VWF eingegrenzt und mit SPR die Bindungskinetik erfasst. Der zweite Abschnitt der Arbeit befasst sich mit der funktionellen Analyse der Pneumokokken VWF-Interaktion, in der vor allem Zellkultur-basierte Infektionsstudien mit primären Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC), Phagozytose-Studien mit THP-1 Makrophagen und Flusskulturanalysen mit dem Mikrofluidiksystem der Firma ibidi® eingesetzt wurden. Abschließend wurden Infektionsstudien zur Interaktion des VWF mit Pneumokokken im Zebrafisch *in vivo* Model durchgeführt.

4.1.1. Analyse der VWF-Bindung an Pneumokokken

Im Folgenden sollte die Bindung von VWF an Pneumokokken untersucht werden. Dies erfolgte unter anderem mit radioaktiv markiertem ^{125}I -VWF und einer Auswahl an Pneumokokken-Serotypen (in Zusammenarbeit mit Prof. Marcus Fulde, HU Berlin). Hierfür wurde der VWF mit ^{125}I -Iod-Isotopen durch eine Standard Chloramine T-Methode markiert. 10^9 Pneumokokken wurden je Serotyp für die Inkubation mit dem ^{125}I -VWF bis zur Mittleren-logarithmischen-Phase kultiviert und mit 20 nCi des radioaktiv markiertem VWF für 30 min bei R.T. inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert und die im Pellet nachzuweisende Radioaktivität als gebunden VWF gemessen in einem gamma counter (Packard). Die Bindung des VWF wurde in Relation zu der gesamten eingesetzten Radioaktivität in Prozent dargestellt (Abbildung 4-1).

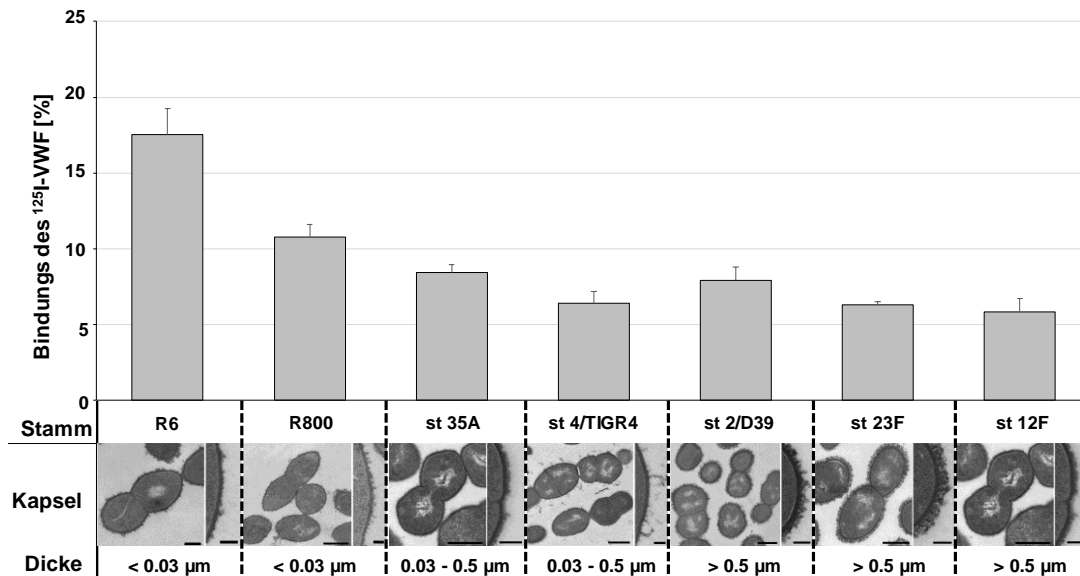


Abbildung 4-1: Bindung von iodiertem VWF an unterschiedlich bekapselte Pneumokokken-Stämme

(A) Bindungsanalyse mit radioaktiv markiertem VWF und sieben *S. pneumoniae* Stämmen: R6, R800 und die Serotypen (st) 35A, 4 (TIGER4), 2 (D39), 23F und 12F. Die VWF-Bindung wird in Prozent im Verhältnis zur gesamt eingesetzten Radioaktivität dargestellt. Der Durchmesser der Polysaccharidkapsel wurde anhand von Transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wie folgt definiert: wenig Bekapselung < 0,03 µm, eine mittlere Bekapselung zwischen 0,03 – 0,5 µm und eine starke Bekapselung > 0,5 µm. Die Maßstabsbalken entsprechen 0,5 µm in den Übersichtsaufnahmen und 0,1 µm in den Ausschnittsvergrößerung. Die elektronenmikroskopische Visualisierung der Kapseldicke erfolgte in Kooperation mit Prof. M. Rohde, HZI Braunschweig.

Ergänzend erfolgte die elektronenmikroskopische Visualisierung der Kapseldicke in Kooperation mit Prof. M. Rohde, HZI Braunschweig. Die Bindungseffizienz schwankt zwischen ca. 17 (st R 6) und 6 % (st 12 F). Bei den sieben für diesen Assay ausgewählten Stämmen handelt es sich um klinische Isolate. Es zeigte sich, dass alle sieben unterschiedlichen Stämme VWF bindet. Die vorgefundenen Kapselstärken wurden in drei Gruppen (< 0,03; 0,03 – 0,5 und > 0,5 µm) eingeteilt und diese sind unter den Balken für die prozentuale VWF-Bindung jedes Serotypen mit einem repräsentativen Bild aus dem Elektronen Mikroskop versehen (M. Rohde, HZI Braunschweig). Dabei konnten die Serotypen mit einer geringeren Kapselstärke, wie der st R6 mit < 0,03 µm mehr radioaktiv markierten VWF binden, also solche mit einer dickeren Kapsel mit > 0,5 µm, wie der st 2/D 39. Es konnte damit gezeigt werden, dass alle getesteten Pneumokokken-Stämme radioaktiv markierten VWF binden.

Um die Frage zu beantworten, welche Proteine auf der Oberfläche der Pneumokokken den VWF binden, wurden 19 Oberflächen Proteine mit einem Western Blot und einer Dot-Spot-Membran mit VWF-Überlagerung getestet. Diese Proteine wurden bis auf die Eno von einem

Kooperationspartner, der AG Prof. Sven Hammerschmidt aus Greifswald zur Verfügung gestellt. Bei den Proteinen handelt es sich um rekombinant exprimierte Oberflächenproteine, die teilweise bekannte Funktionen haben (Die Rohdaten zur PI zu den Proteinen befinden sich im Anhang). Nach einer Bradfordkonzentrationsbestimmung (3.3.4) wurde je 1 µg der Proteine auf zwei 12% SDS Gel aufgetragen, wobei ein Gel für die Coomassie-Färbung und das andere für einen Western Blot und eine anschließende VWF-Überlagerung genutzt wurde. Die Überlagerung wurde mit 2,5 µg/mL VWF ü.N. durchgeführt und anschließend die Membran mit dem VWF-spezifischer Primär- und einen Sekundär-Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase (AP) inkubiert und in Gegenwart einer BCIP/NBT-Lösung entwickelt. Anhand der Coomassie-Gelbilder in Abbildung 4-2 A und B ist zu erkennen, dass es sich teilweise, wie bei dem Protein PpmA um sehr reine Proteine handelt.

Auf den SDS-Gelen A und B befinden sich Banden bei 17 der Oberflächenproteine in den Bereichen der theoretisch ermittelten Molekulargewichte (vgl. Abbildung 4-2 und

Tabelle 4-1, Masterarbeit Valentina Elspaß, 2017). Lediglich die intensivsten Banden bei SIrA befinden sich mit ca. 38 kDa über dem erwarteten Molekulargewicht von 28 kDa und bei SP_2063 befindet sich die stärkste Bande bei ca. 68 kDa und nicht bei 40 kDa. Zudem ist die Bande bei PccL_70-152 aa sehr schwach im Vergleich zu den anderen Intensitäten. Die Eno weist z.B. zwei Banden auf, wobei es sich bei der Bande bei ca. 45 kDa um die erwartete Höhe handelt. Die Bande bei ca. 90 kDa könnte ein Dimer sein.

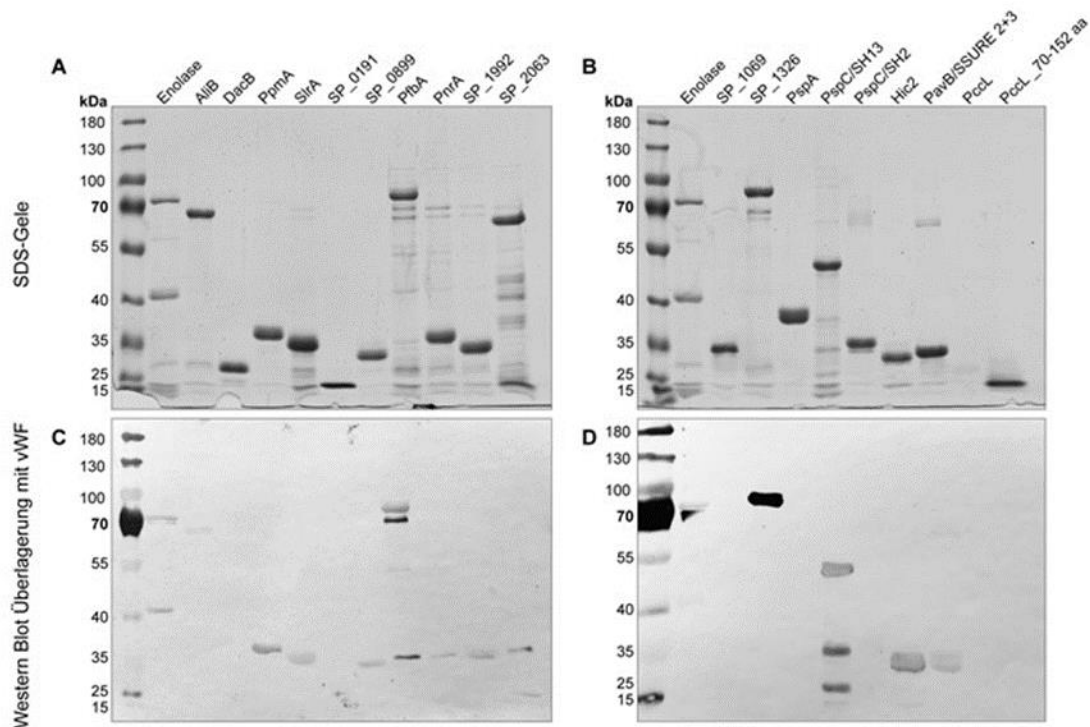


Abbildung 4-2: SDS-Gele und Western Blots der Oberflächenproteine von *S. pneumoniae*

In den Teilabbildungen (A+B) sind jeweils ein SDS-Gel und der dazugehörige Western Blot in (C+D) gezeigt. 1 µg Eno wurde in beiden Fällen als Positivkontrolle neben dem Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder) aufgetragen. Von jedem Oberflächenprotein wurde ebenfalls 1 µg Protein aufgetragen. Im Gel für den Western Blot (D) war die Tasche des Markers beschädigt, etwas Marker ist in die Tasche der Eno übergelaufen. Abbildung aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Western Blots

Interaktionsstärke der Oberflächenproteine mit vWF von sehr schwach (+) über schwach (++) , mittel (+++) und stark (++++) bis sehr stark (+++++). Tabelle aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

Oberflächenprotein	MW ca. [kDa]	Interaktion mit vWF	Stärke der Interaktion
AliB	72	ja	+
DacB	27	nein	
PpmA	33	ja	++
SlrA	28	ja	+
SP_0191	21	nein	
SP_0899	33	ja	+
PfbA	72	ja	++++
PnrA	37	ja	+
SP_1992	22	ja	+
SP_2063	40	ja	+
SP_1069	34	nein	
SP_1326	82	ja	+++++
PspA	37	nein	
PspC/SH13	50	ja	+++
PspC/SH2	35	nein	
Hic2	30	ja	++
PavB/SSURE 2+3	33	ja	+
PccL	17	k. A.	
PccL_70-152 aa	12	nein	

Von den 19 untersuchten Proteinen zeigten im Western Blot 13 Proteine ein Signal, was eine Interaktion nachweist. Von diesen Proteinen 13 zeigt SP1326 eines der stärksten Signale. Sechs Proteine, DacB, SP_0191, SP_1069, PspA, PspC/SH2 und PccL_70-152 aa hingegen zeigen kein Signal. Dies könnte bei PccL_70-152 aa auch an der geringeren Menge liegen, die auf dem Gel vorlag (Siehe Abbildung 4-2).

Zusätzlich zu der denaturierenden SDS-Page Auftrennung wurde auch ein nativer Dot-Spot-Array durchgeführt, bei dem die Proteine ihre Konformation behalten. Für diesen wurde auf zwei Nitrocellulosemembranen je 0,1 und 1 µg des jeweiligen Proteins aufgetragen, um auch eine konzentrationsabhängige Bindung überprüfen zu können. Aufgrund der geringeren Ausgangskonzentration der Eno wurden Spots mit 0,5 µg und 0,05 µg Protein aufgetragen. Zudem wurde ein weiterer Spot mit 1 µg Eno aufgetragen. Dies war nötig, da das Volumen der Probe so groß war, dass es separat aufgetragen werden musste. Anschließend wurde die Überlagerungsmembran analog zum Western Blot mit 2,5 µg/mL VWF-Lösung ü.N. inkubiert. Die VWF-Bindung wurde mit dem VWF-spezifischer Primär-Antikörper und einen Sekundär-Antikörper mit gekoppelter AP inkubiert und in Gegenwart einer BCIP/NBT-Lösung entwickelt (Abbildung 4-3 A). Die negative Kontrolle wurde nur mit dem Primär- und Sekundär-Antikörper inkubiert und weist nur beim VWF-spot ein Signal auf, was die Spezifität der Antikörper aufzeigt (Abbildung 4-3 B).

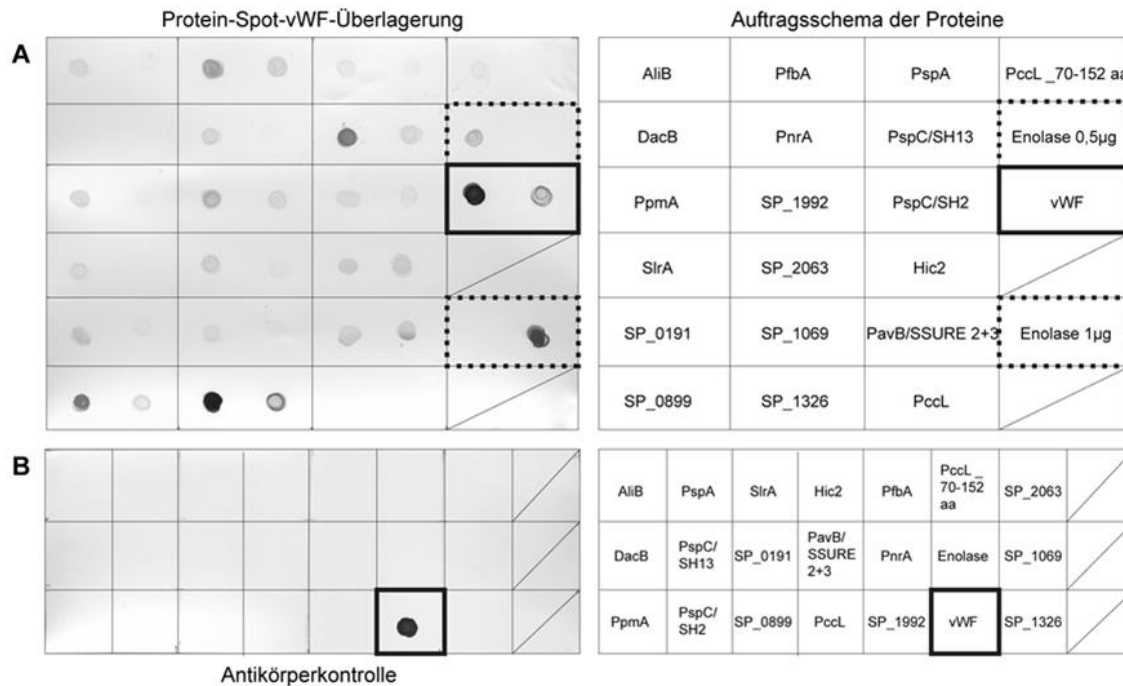


Abbildung 4-3: Ergebnis der Protein-Spot-VWF-Überlagerung unter nativen Bedingungen

(A) Spotmembran nach VWF-Inkubation und Antikörperdetektion des gebundenen VWF. In jedem Feld wurden 1,0 µg (links) und 0,1 µg (rechts) Protein aufgetragen. Als Antikörper-Bindungskontrolle wurde in dem durchgängig umrandeten Feld 1,0 µg und 0,1 µg VWF aufgetragen. Zur Kontrolle der VWF-Bindung wurde in den gestrichelt umrandeten Feldern 0,5 µg und 1,0 µg Eno aufgetragen. (B) Kontrollmembran zum Nachweis unspezifischer Antikörperdetektion. Die Signalentwicklung mittels Antikörperdetektion erfolgte ohne vorherige VWF-Inkubation der Kontrollmembran. In jedem Feld wurde 1,0 µg Protein aufgetragen. Im durchgängig umrandeten Feld wurde 1,0 µg VWF als Positivkontrolle für die Antikörperdetektion aufgetragen. Abbildung aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

Um eine quantitative Beurteilung der Signalstärke zu ermöglichen wurde die Pixel-Intensität (PI) der Spotsignale mit dem Programm ImageJ (Nationale Gesundheitsinstitute der USA) ermittelt. Die Abbildung 4-4 zeigt in einem Balkendiagramm die ermittelten Intensitäten der Spots.

Diese wurde in Relation mit dem aufgetragenen VWF als positives Signal mit einer Intensität von ca. 191.000 Pixelintensitäten (PI) bei 1 µg und ca. 60.000 PI bei 0,1 µg gesetzt. Eine spezifische Interaktion mit den VWF wurde definiert, als eine PI über 50.000 bei 1 µg Protein und gleichzeitig einer PI des 0,1 µg Protein-Spots, die maximal dem halben Signal des 1 µg Spots entspricht. Die Eno zeigte hierbei ein starkes Signal mit 143.000 PI (1 µg) und ca. 36.000 PI bei 0,5 µg. Vier der getesteten anderen Oberflächenproteine zeigten ebenso Werte, die auf eine spezifische Bindung des VWF nach der oben gewählten Definition hindeuteten. Die 1 µg Spots von SP_1326, PspC/SH13, PfbA und SP_0899 zeigen eine PI > 50000 des 1 µg Spots und eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit, verglichen zum 0,1 µg Spot. Die Spots des Proteins SP_1326 zeigen die stärkste Farbreaktion der getesteten Oberflächenproteine mit

Intensitäten von ~181.000 PI (1 µg) und ~65.000 PI (0,1 µg). Dies entspricht einem Faktor von 1,3 im Vergleich zu dem zweitstärksten Signal der Eno mit ~143.000 PI (1 µg). Die Proteine PspC/SH13, SP_0899 und PfbA zeigen Werte bei 1 µg von 100.000 PI, 73.000 PI und 64.000 PI. Die Intensitäten der Spots von AliB, PpmA, SlrA, SP_0191, PnrA, SP_1992, SP_2063, SP_1069, PspA, PspC/SH2, Hic2, PavB/SSURE 2+3 und PccL_70-152 aa sind sehr schwach (PI < 50000) und weisen keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Konzentrationen auf.

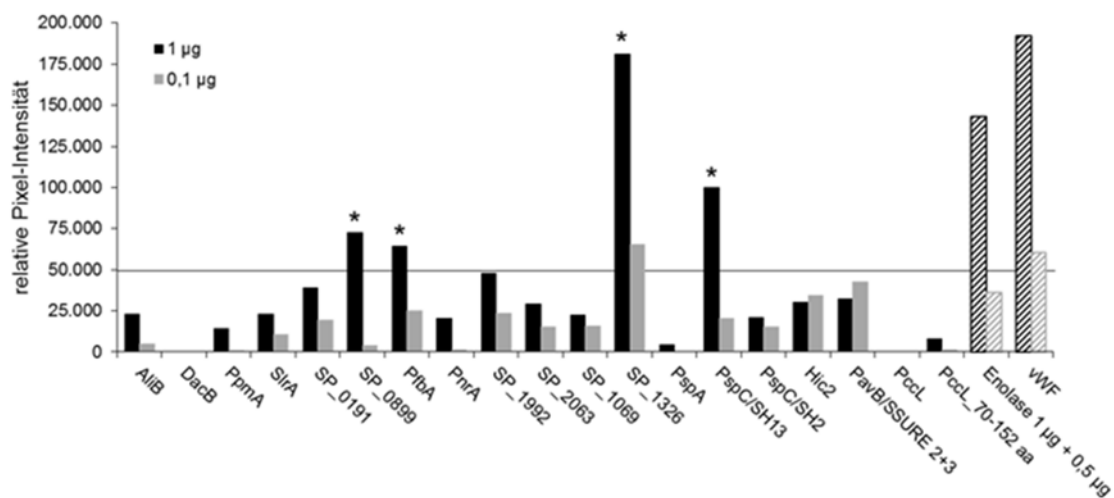


Abbildung 4-4: Quantifizierung der VWF-Bindungssignale der Spotmembran

Die Quantifizierung wurde mit dem Programm ImageJ (Nationale Gesundheitsinstitute der USA) durchgeführt. Die Pixel-Intensität wurde relativ zum Hintergrundsignal der Spotmembran betrachtet. Markierte Oberflächenproteine weisen eine spezifische VWF-Bindung auf (Pixel-Intensität > 50.000 und konzentrationsabhängige Bindung). Abbildung aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

Somit konnte gezeigt werden, dass Pneumokokken in Abhängigkeit von der Kapselstärke VWF binden. Je weniger ausgeprägt die Kapseldicke war, desto stärker war die Interaktion. Zudem konnten von 19 Pneumokokken-Oberflächenproteinen 13 als VWF-Binder identifiziert werden, von denen neben der Eno vier eine starke Interaktion aufweisen. Im Weiteren wurde mit der Eno weitergearbeitet, da diese zusätzlich auch Plasminogen binden kann (Bergmann *et al.*, 2001, 2003). Im Folgenden wurde die VWF-Interaktion mit der Pneumokokken-Eno näher untersucht, denn es handelt sich um ein Oberflächenprotein, das in vorherigen Studien zur Plasminogen-Interaktion bereits betrachtet wurde und dessen Molekülstruktur aufgeklärt werden konnte (Ehinger *et al.*, 2004). Zudem wurde die Eno bereits als Plasminogen-Bindungsprotein charakterisiert, so dass sich eine vergleichende Betrachtung der

Bindungseigenschaften für Komponenten aus dem Blutstrom anbietet. Durch die Bindung von VWF, als auch von Plasminogen könnten die Pneumokokken einen möglichen Einfluss auf das Hämostase Gleichgewicht haben. Zudem könnten die Eno somit auch während einer bakteriellen Sepsis entscheidend sein für die Ausbreitung im Blutstrom und Körper. Dieses wurde schon ausführlich beschrieben (Bergmann *et al.*, 2001, 2003).

4.1.2. Verifizierung der Pneumokokken-Enolase VWF-Bindungsproteine

Wie oben erwähnt, wurde die Eno bereits in frühen Studien als Oberflächenassoziertes Plasminogen-Bindungsprotein identifiziert (Bergmann *et al.*, 2001, 2003) und als His6-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* M15 produziert. Im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit sollte mit der Eno die Bindung des VWF weiter verifiziert werden. Dazu wurde sie auch rekombinant in *E. coli* M15 produziert und affinitätschromatographisch gereinigt. Die gepoolten und dialysierten Elutionsfraktionen E3 und E4 wurden auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen, dieses geblottet wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben und anschließend mit einem spezifischen polyklonalen anti-Eno-Primär-Antikörper inkubiert. Das Coomassie Gel (A), die Silbernitratfärbung (B) und der Blot (C) sind in Abbildung 4-5 zu sehen.

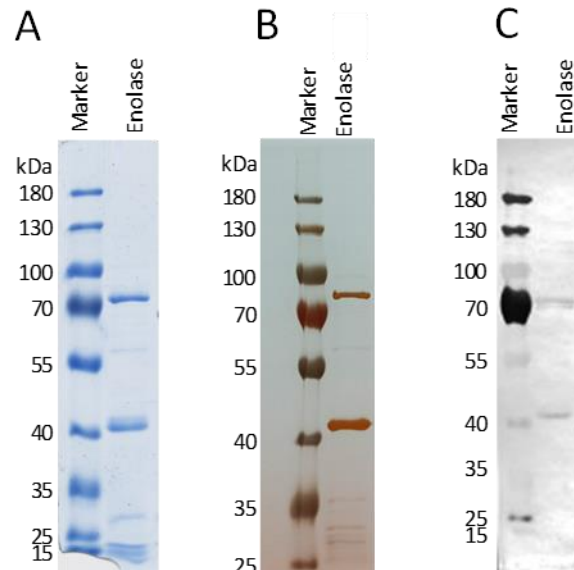


Abbildung 4-5: Molekulargewichtskontrolle der verwendeten Eno-Proteinfraktionen

(A) zeigt das Ergebnis der Coomassie-Färbung nach SDS-Gelelektrophorese der gereinigten Eno-Fraktion. In (B) ist eine sensitivere Silbernitratfärbung zu sehen, die auch kleine Mengen an Verunreinigungen oder Degradationsprodukten visualisiert. (C) zeigt das Ergebnis der Immundetektion der Eno im Western Blot mit spezifischen Antikörpern aus dem Kaninchen. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Sowohl die Coomassie Färbung (Abbildung 4-5 A), als auch die Silberfärbung (Abbildung 4-5 B) zeigen neben der erwarteten Bande bei ca. 45 kDa eine weitere starke Bande bei etwa 90 kDa. Hierbei sollte es sich um ein Eno-Dimer handeln, welches nicht durch das SDS und den β -Mercaptoethanol denaturiert wurde. Dafür spricht auch, dass sowohl die Bande bei ca. 45 kDa, als auch die bei 90 kDa durch den anti-Eno-Antikörper detektiert wurden (Abbildung 4-5 C). Die Silberfärbung nach Kapitel 3.3.6 wurde eingesetzt, weil sie sensitiver ist, als die Coomassie Färbung und daher auch schwache Proteinbanden färbt, um auch geringe Verunreinigungen zu visualisieren. Das in Abbildung 4-5 B dargestellte Bild der Silberfärbung zeigt, dass nur wenige Verunreinigungen vorhanden sind.

Im Anschluss wurde mit der dargestellten Eno-Fraktion weitergearbeitet und in einem ersten Schritt die konzentrationsabhängige Interaktion mit dem VWF mit Hilfe eines Dot-Spot-Assays untersucht. Dazu wurde sowohl die Eno in zunehmender Konzentration von 0,375 μ g bis zu 3 μ g, als auch der VWF als Positivkontrolle auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Nach einer Inkubation der Membran mit 20 μ g VWF wurde die VWF-Bindung über einen VWF-spezifischen Primär- und einen Sekundär-Antikörper detektiert. Letzterer war zur Detektion an eine AP gekoppelt. Es konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung des Detektionssignals beobachtet werden (Abbildung 4-6 A).

Um den Anteil an Hintergrundsignalen aufgrund unspezifischer Antikörperbindung detektieren zu können, erfolgten Kontrollinkubationen identisch erstellter Spotmembranen mit Inkubation der Primär- und Sekundär-Antikörper ohne eine Überlagerung mit VWF. Die in Abbildung 4-6 B dargestellten Kontroll-Inkubationen bestätigen, dass die VWF-spezifischen Antikörper auch wie erwartet das immobilisierte VWF-Protein detektieren, während das immobilisierte Eno-Protein lediglich mit äußerst schwacher unspezifischer Signalintensität bei der höchsten Proteindetektion unspezifisch bindet (Abbildung 4-6 B, 3 μ g Eno).

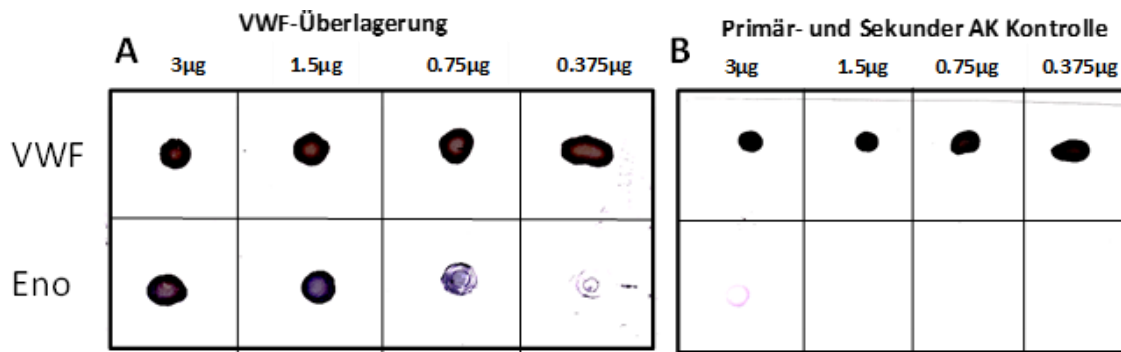


Abbildung 4-6: Konzentrationsabhängige Bindung von VWF durch die Pneumokokken Eno

In (A) und (B) ist sowohl die Eno, als auch der VWF als Positiv-Kontrolle für den Antikörpernachweis in steigender Menge von 0,375 bis 3 µg aufgetragen. In (A) erfolgte eine VWF-Überlagerung mit 20 µg VWF ü.N. und die Inkubation mit dem anti-VWF-Primär- und Sekundär-Antikörper sowie die anschließende Detektion des Sekundär-Antikörpers über die gekoppelte AP und eine Farbreaktion mit BCIP/NBT-Lösung. In (B) ist die Inkubation einer identisch hergestellten Membran mit dem Primär- und Sekundär-Antikörper, aber ohne eine VWF-Überlagerung gezeigt.

4.1.3. Optimierung der Messparameter zur Bindungsanalyse durch Microscale

Thermophorese

Nachdem mit den Western Blots und der Eno-Spot Membranen eine spezifische Bindung des VWF nachgewiesen werden konnte, sollte mit der Microscale Thermophoresis (MST) eine Dissoziationskonstante für die Bindung bestimmt werden.

Die Messungen erfolgten mit dem Monolith NT.115 (Nano Temper Technologies GmbH) in der AG von Dr. Andrea Scrima am HZI Braunschweig. Das Prinzip der Messung beruht auf der gerichteten Bewegung von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten. Diese wird als Thermophorese bezeichnet und hängt von Größe, Ladung und Hydrathülle des Moleküls ab, die sich bei Bindung eines Liganden verändern. Die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Bindungspartners ermöglicht die quantitative Bestimmung von Bindungsparametern. Hierzu musste jedoch ein eGFP-VWF Monomer eingesetzt werden, da eine Multimerisierung der zu testenden Proteine die Messung erschwert. Zuerst erfolgten verschiedene Kontrollmessungen mit dem VWF-Monomeren und Pneumokokken-Eno. Die MST-Messungen erforderten die Nutzung eines durch aminosäuremodifikationen generierten VWF-Monomers, da die Dimerisierungs- und Multimerisierungstendenz des VWF zu falschen Messsignalen führen würde. Die Rohdaten der MST-Messungen wurden mit dem Auswertungsprogramm *MO.Affinity Analysis v2.2.4* der Firma NanoTemper Technologies analysiert und als Excel-Dateien oder Grafiken exportiert.

Die MST-Bestimmung wurde unter der Prämisse durchgeführt, dass die Eno von *S. pneumoniae* unter physiologischen Bedingungen als Oktamer vorliegt (Ehinger *et al.*, 2004). Das in *E. coli* rekombinant produzierte Protein liegt in Lösung in verschiedenen Oligomerisierungsstadien vor, die sich konzentrationsabhängig verschieben. Für die Messungen wurde die Eno mit einem RFP-Kit des Herstellers markiert und zu unmarkierter Eno titriert und die Änderung des Fluoreszenzsignales beobachtet. Eine valide Datenauswertung erfordert eine Fluoreszenzintensität von mindestens 200 Counts (Abbildung 4-7). Mit dem Ziel, einer artifiziellen Hintergrunddetektion durch Multimerisierung der Eno vorzubeugen, wurde anhand der in dargestellten Testergebnisse dessen Konzentration als fluoreszenz-konjugierter Ligand möglichst geringgehalten (Daten im Anhang). Die Ergebnisse des "Cap Scans" zeigten, dass bei einer Eno-Konzentration von 25 nM nahezu keine Multimerisierungssignale auftreten, die eine Bindungsmessung beeinflussen könnten (Daten sind dem Anhang zu entnehmen).

Die nicht markierte Eno wurde in einer abfallenden 1:2 Verdünnungsreihe dazu titriert mit einer maximalen Konzentration von 300 nM. Nach einer Inkubation von 30 min erfolgte die MST-Messung mit 40% LED Leistung und 40% MST Leistung in Standardkapillaren. Ebenso wurde aufgrund der Fluoreszenz-Markierung des eingesetzten VWF-Monomers mit einem eGFP eine Kontrollmessung mit einem zur Verfügung gestelltem GFP durchgeführt (bereitgestellt von Dr. S. Wienecke, TU Braunschweig) um eine unspezifische Bindung der markierten Eno an das eGFP ausschließen zu können. Zu diesem Zweck wurde das GFP zu der 25 nM markierter Eno gegeben und eine Bindungsmessung bei 40% LED Leistung und 40% MST Leistung in Standardkapillaren durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Anhang in dargestellt. Die Änderung der normalisierten Fluoreszenz der markierten Eno über den Konzentrationsverlauf des GFP ist gering und somit zu vernachlässigen (siehe Anhang). Eine Interaktion zwischen dem eGFP und Eno kann somit ausgeschlossen werden. Aufgrund dessen kann bei der Bindungsmessung von dem eGFP-VWF-Monomer und der RFP-markierten Enolase durchgeführt werden. Im Anhang wird die Zunahme der Fluoreszenz mit steigender VWF-monomer Konzentration dargestellt.

Dieser wurde eingesetzt, da ansonsten nicht sichergestellt werden konnte, dass der VWF nicht in diversen Multimer-Formen vorliegt und somit eine Messung nicht reproduzierbar wäre. Die Analyse der Bindungsinteraktion zwischen markierter Eno und VWF-Monomeren erfolgte als Triplikat. Die markierte Eno wurde mit einer Konzentration von 25 nM vorgelegt und die VWF-Monomere in einer abfallenden 1:2 Verdünnungsreihe dazu titriert (Kapitel 3.3.12). Eine Messreihe enthielt 16 Proben mit einer VWF-Monomer-Konzentration von 0,00977 nM bis 320 nM. Die Proben wurden 30 min inkubiert und anschließend bei 40% LED Leistung und

40% MST Leistung in Standardkapillaren gemessen. Vor jeder MST-Messung wurde die initiale Fluoreszenz aller 16 Proben beurteilt (*Cap Scan*). Die Messkurven von drei Messungen sind in Abbildung 4-7 B dargestellt. Mit dem blauen Pfeil wird die Abnahme der Fluoreszenz durch die Infrarotstrahlung markiert, mit dem roten Pfeil das Ausstellen der Infrarot Bestrahlung.

Alle Proben wiesen ein Fluoreszenzsignal über 200 Counts auf und wiesen eine genügend hohe Fluoreszenzintensität auf, um ausgewertet werden zu können (Abbildung 4-7 A). Die Signale der drei Messreihen sind farblich markiert und übereinandergelegt (Abbildung 4-7 B). Die Schwankungen der einzelnen Kapillaren mit gleichen Konzentrationen beider Proteine innerhalb der drei Messreihen waren sehr gering bis nicht detektierbar. Die ersten beiden Kapillaren zeigen eine initiale Fluoreszenz von 260-270 „Counts“ (Abbildung 4-7 A). Die Signalspitzen der restlichen Kapillaren erreichen ein Maximum von 300 ± 20 „Counts“. Die initiale Fluoreszenz der ersten beiden Kapillaren weicht damit um ca. 10% von den Werten der restlichen Kapillaren ab. Diese Abweichung liegt an der Grenze, der vom Hersteller tolerierten Abweichung und muss somit kritisch betrachtet werden. Diese Abweichungen sind für eine qualitative Aussage jedoch nicht von Bedeutung. Eine Interaktion der Proteine mit den Standardkapillaren kann somit ausgeschlossen werden.

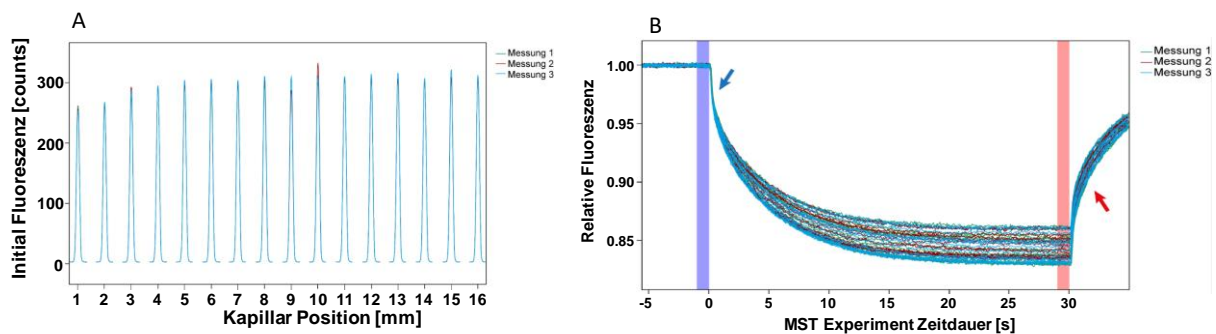


Abbildung 4-7: Kontrolle der initialen Fluoreszenz und MST-Kurven der Bindungsmessungen der Eno mit dem eGFP-VWF-Monomer

(A) stellt die Kontrollemessung der initialen Fluoreszenz vor den Bindungsmessungen dar. Die ursprüngliche Fluoreszenz der Proben wurde vor jeder der drei MST-Messungen aufgenommen und ist auf der Ordinate dargestellt. Auf der Abszisse ist die Kapillarposition abzulesen. Die Signale der drei Messreihen sind übereinandergelegt. Die Fluoreszenzintensität sämtlicher Proben liegt über 200 Counts. Die meisten Proben weisen eine gleichmäßige Höhe der Counts auf. Nur die „Initial Fluoreszenzcounts“ der ersten beiden Kapillaren weichen um ca. 10 % von den Werten der restlichen Kapillaren ab. Diese Abweichung liegt an der Grenze der tolerierten Abweichung. In (B) sind die drei MST-Kurven der Bindungsmessungen der Eno mit dem eGFP-VWF-Monomer dargestellt. Die MST-Kurven der Bindungsmessungen von VWF-Monomeren und Eno sind pro Messreihe farblich markiert. Ab dem Startpunkt der Messung bei 0 s wurden die Proben erhitzt, dies zeigt sich durch den Temperatursprung in den Kurven (blauer Pfeil). Die Kurve nähert sich anschließend dem Fließgleichgewicht an und eine Rückdiffusion (roter Pfeil) ist nach dem Ausschalten des IR-Lasers (bei 30 s) zu erkennen. Die Werte aus dem blauen und aus dem roten Bereich werden für jede Kurve gemittelt. Aus den

gemittelten Werten werden dann die Differenzen berechnet und damit eine Bindungskurve von dem Auswertungsprogramm *MO.Affinity Analysis* v2.2.4 erstellt. Abbildung aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

Aus den einzelnen Bindungskurven wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen für jede Konzentration des VWF-Monomers bestimmt und damit die gemittelte Bindungskurve in Abbildung 4-8 A erstellt. Abbildung 4-8 A zeigt die Differenz der normalisierten Fluoreszenz der RFP-markierten Eno über die Konzentration des eGFP-VWF-Monomers. Die Kurve zeigt den Verlauf eines typischen Bindungsverhaltens. Aufgrund der limitierten Menge an zu Verfügung stehendem VWF-Protein konnte der Bindungsverlauf nicht im Bereich der Bindungssättigung dargestellt werden. Mit dem vom Hersteller NanoTemper bereitgestellten Auswertungsprogramm *MO.Affinity Analysis* v2.2.4 können zwei verschiedene Fit-Methoden auf die Bindungskurven angewandt werden, um das Bindungsverhalten anhand der gemessenen Werte zu beurteilen. Hierzu werden sämtliche Informationen zur Qualität der Bindungsinteraktion wie z.B. Konformationsänderung und Kooperativitätseffekt mit einbezogen. Es kann zwischen einem K_d -Fit und einem Hill-Fit gewählt werden. Die Option Hill-Fit zeigte eine deutlich bessere Näherung an die Messdaten, als die K_d -Fit Methode. Entsprechend wurde der Hill-Fit auch für die Regressionskurven in Abbildung 4-8 A genutzt.

Die bessere Eignung des Hill-Fit wiederum weist darauf hin, dass es sich bei der Bindung der Eno mit dem eGFP-VWF-Monomer um eine negativ kooperative Bindung handelt, die unter anderem wegen sterischer Behinderung eine Reduktion der Bindungsgeschwindigkeit in Interaktionsverlauf aufweist. Die Werte für die errechneten K_d -Werte und Hill-Koeffizienten mit 0,567 sind in Abbildung 4-8 B aufgeführt. Aus der Evaluation der Daten wird ein K_d -Wert von $4,65 \times 10^{-9}$ M ermittelt, der für eine starke und daher physiologisch relevante Bindungsinteraktion spricht.

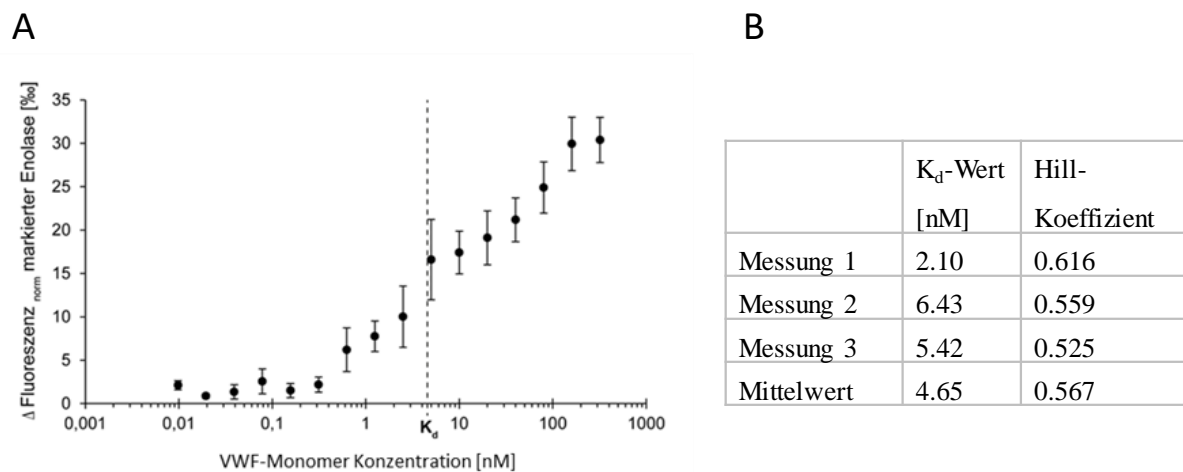


Abbildung 4-8: Bindungsdaten zur Eno-VWF-Interaktion sowie K_d -Wert und Hill-Koeffizient der MST-Bindungskurven. In (A) ist die Bindungskurve dargestellt. Diese wurde als Mittelwert mit Standardabweichungen aus drei Einzelmessungen erstellt. In (B) sind die in drei voneinander unabhängigen Messungen ermittelten K_d -Werte und Hill-Koeffizienten aufgeführt und die Mittelwerte. Aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

Die Ergebnisse der MST-basierten Bindungsanalyse bestätigt die Interaktion zwischen der Eno und den VWF-Monomeren.

4.1.4. SPR-Messung zur Ermittlung der Bindungsparameter der Interaktion zwischen Enolase und VWF

Zur Validierung der in MST-Analysen ermittelten Bindungseigenschaften der Eno-VWF-Interaktion sollte die surface plasmon resonanz (SPR) als zweite Methode eingestetzt werden zur Bestimmung des K_d für die Interaktion. Der aus Plasma isolierte VWF der Firma Merck liegt im Gegensatz zum oben verwendeten monomeren VWF vorwiegend als dimerisiertes, globuläres Molekül vor. Die SPR Messungen erfolgten bei einem Kooperationspartner in der AG Prof. Sven Hammerschmidt in Greifswald.

Die Messungen wurden an einem BIAcore T200 (GE Healthcare, Munich, Germany) durchgeführt. Dafür wurde die Eno an einen CM5 Sensorchip als Ligand kovalent gebunden. Die Bindung wurde über eine Standard Amin Kupplungsreaktion hergestellt. Die Bindungsanalysen in der Microfluidic-Kammer wurden in PBS (pH 7,4) mit 0,05 % Tween 20 bei 25°C und einer Flussrate von 10 μ L/min durchgeführt. Der VWF wurde als Analyt in den Puffer gegeben und in den Konzentrationen 0,625; 1.25; 2.5; 5.0; and 10,0 μ g/mL über die immobilisierte Eno geleitet. Die Bindungsfähigkeit des Liganden wurde durch 2 mM NaOH wiederhergestellt und der Assay in drei unabhängigen Messungen wiederholt. Die Rohdaten

der Bindungskinetik Parameter, Gleichgewichts-Affinitätsbedingungen sowie die χ^2 -Werte (siehe Anhang) wurden in der BIAcore T200 Software Version 3.0 ausgewertet.

Dabei konnte aus den drei Messungen das in Abbildung 4-9 dargestellte Sensogramm ermittelt werden. Für die Bindungskinetiken der Eno mit dem aus Plasma isolierten VWF (Merck) wurden die Eno immobilisiert als Ligand an einen CM5 Biacore Chip. Der VWF wurde in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,6125 bis 10 $\mu\text{g/mL}$ als Analyt eingesetzt bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L/min}$. Die ermittelten Sensogramme sind den eingesetzten Konzentrationen entsprechend in unterschiedlichen Farben dargestellt. Es konnte ein K_d von $6,72 \times 10^{-8}$ M ermittelt werden. Dieser K_d liegt in der Grenze zum nanomolekularen Bereich, was für eine sehr starke Bindung spricht. Mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$ VWF konnten RU Werte von knapp über 100 erreicht werden. Die Daten wurden in zwei voneinander unabhängigen Messungen generiert im Gleichgewichtszustand mit einem χ^2 -Wert von 0,665.

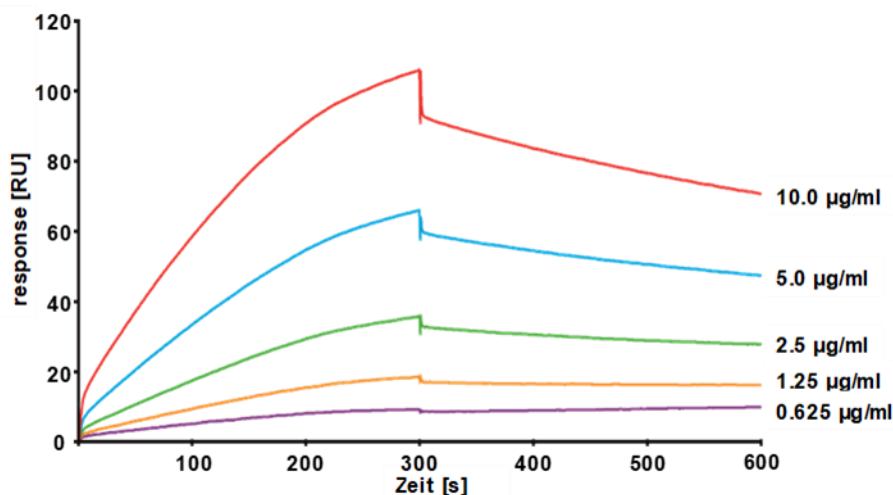


Abbildung 4-9: Ergebnis-Sensogram der SPR-Analyse zur VWF-Eno-Bindungskinetik

Dargestellt sind die aufgenommenen Sensogramme der Interaktionsmessung von der Eno mit dem VWF. Die Messungen wurden mit einer VWF-Konzentration von 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; and 10,0 $\mu\text{g/mL}$ durchgeführt. Als Analyt diente der VWF, die Eno wurde als Ligand an einen CM5 Sensorchip über einen Standard Amin Kupplungsreaktion gebunden. Es konnte K_D von $6,72 \times 10^{-8}$ M ermittelt werden. Bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$ VWF konnten RU Werte über 100 erreicht werden. Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt mit einem χ^2 -Wert von 0,665. Die Bindungsanalysen wurden in PBS (pH 7,4) mit 0,05 % Tween 20 bei 25°C und einer Flussrate von 10 $\mu\text{L/min}$ durchgeführt und mit der BIAcore T200 Software Version 3.0 ausgewertet von Dr. Thomas Kohler, AG-Hammerschmidt, Universität Greifswald.

Die Ergebnisse der SPR-Analysen bestätigen eine konzentrationsabhängige Interaktion zwischen Eno und VWF aus humanem Plasma und weisen auf eine starke Interaktion der beiden Moleküle hin.

4.1.5. Eno-Peptid-Spotmembran Analyse zur Auffindung von VWF

Interaktionspeptiden.

Nachdem eine konzentrationsabhängige Interaktion zwischen Eno und VWF aufgezeigt werden konnte und ein K_d bestimmt wurde, der für eine physiologische Interaktion repräsentativ ist, sollten die für die Interaktion relevanten Bereiche ermittelt werden. Dazu wurde eine Eno-Peptid-Spotmembran genutzt, die von einem Kooperationspartner, der AG von Dr. Werner Tegge, HZI Braunschweig hergestellt wurde. Dafür wurde die 434 AS lange Sequenz der Pneumokokken Eno in 141 Peptide aufgeteilt, je in 15 mere, die jeweils in 12 AS überlappen (Peptidzusammensetzung im Anhang). Die Sequenz verschiebt sich in jedem Spot um drei AS. Bei der Peptid-Spot-Analyse handelt es sich um eine Bindungsanalyse auf Basis der Primärstruktur eines Proteins zur Erfassung von Aminosäurebindungsmotiven.

Die Nitrocellulosemembran wurde wie in 3.3.8 beschrieben inkubiert mit einer VWF-Überlagerung einer Lösung mit 20 µg ü.N. Anschließend wurde die VWF Bindung durch den spezifischen anti-VWF-Primär-Antikörper und einen Sekundär-Antikörper nachgewiesen, an dem eine AP gekoppelt war. Als Substrat wurde hier Chloronaphthol eingesetzt. Abbildung 4-10 zeigt das Ergebnis der VWF-Bindungsdetektion nach Inkubation der Eno-Peptid-Membran mit VWF und mit den VWF-spezifischen Antikörpern. Die Eno-Peptid-Membran ist in Abbildung 4-10 A1 zu sehen, wie auch die Antikörper-Kontrollen in A2 und A3. Wobei die Membran in A2 nur mit dem Sekundärantikörper und die in A3 nur mit dem Primär- und Sekundär-Antikörper inkubiert wurde, aber ohne Überlagerung mit einer VWF-Lösung.

In der Abbildung 4-10 B sind jeweils sieben positive Signalregionen markiert (und durch entsprechende Nummern gekennzeichnet), die sich teilweise über mehrere Protein-Spots ausdehnen. Somit konnten sieben Interaktionsmotife/Bereiche identifiziert werden. Auf den Negativkontrollen für den Primär- und Sekundär-Antikörper und den Sekundär-Antikörper (Abbildung 4-10 A2+A3) ohne VWF Überlagerungen sind nur leichte Signale bei vereinzelt Spots in den Motifen 3, 5, 6 und 7 zu erkennen. Dabei wurde im Folgenden das Motif Nr.3 als potenzielles Interaktionspeptid weiterbearbeitet. Die AS Zusammensetzung aller sieben Motife ist im Anhang aufgeführt. Um die Signale quantitativ besser miteinander vergleichen zu können, wurden diese densitometrisch ausgewertet mit der Software ImageJ, (Abbildung 4-10 B) nach Subtraktion der unspezifischen Bindungssignale aus den Antikörperkontrollen. Das Interaktions-Motif Nr.3 ist in Rot markiert, genauso wie das zentrale Bindungsmotif in Abbildung 4-10 A1. Ein charakteristisches Interaktionssignal gestaltet sich dabei durch eine sich langsam steigende Signal-Intensität, welche relativ abrupt abbricht. Dies würde so nur auf

die Motife 1, 3 und 6 zutreffen. Bei der densitometrischen Auswertung hat der Spot mit dem stärksten Signal die Sequenz $^{195}\text{YGAEIFHALKKILKS}^{210}$ und wird im Folgenden als Interaktionspeptid Nr. 3 bezeichnet. Die anderen sechs detektieren putativen Interaktions-Motife sind in den Farben grün, blau, gelb, lila, hellblau und dunkelgrün dargestellt in Abbildung 4-11.

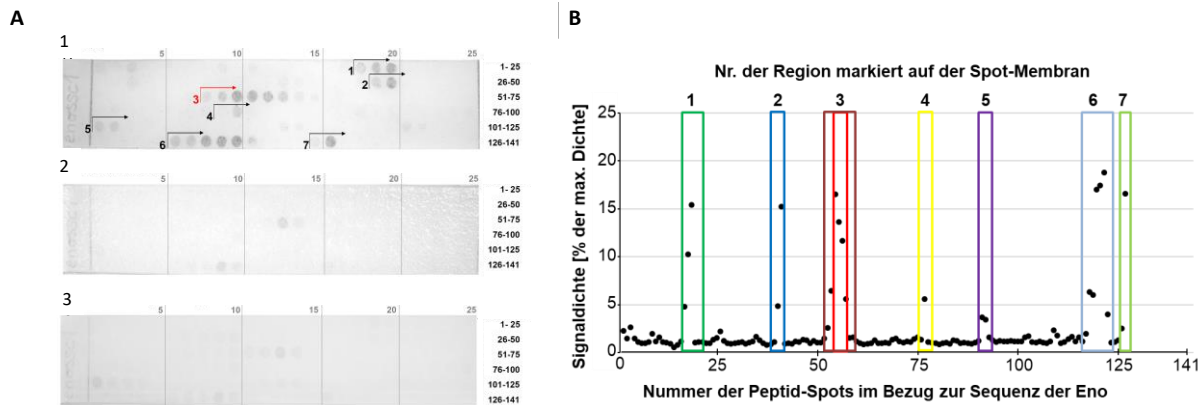


Abbildung 4-10: Ergebnis des Enolase-Peptidarrays

In (A) ist die Eno-Peptid-Membran dargestellt mit vorheriger VWF-Überlagerung mit 20µg VWF (A1) und nach Inkubation mit dem Primär- und Sekundär-Antikörper (A2), sowie nur dem Sekundär-Antikörper ohne eine VWF-Überlagerung (A3). Am oberen Rand der Membranen ist von 5 bis 25 die Anzahl der Spots und am rechten Rand die Position der Spots in der 141-AS langen Eno-Sequenz dargestellt. Mit Zahlen von 1 bis 7 und schwarzen Pfeilen in Richtung des Signals sind sieben Bindungsmotife hervorgehoben (A1). In rot hervorgehoben ist in (A1) das Motif mit der Nr. 3, welches im Anschluss weiter analysiert wurde als putatives VWF-Bindungsmotif. In (B) ist die densitometrische Auswertung der Intensitäten der Signale der Überlagerungs-Membran aus (A1) mit dem Programm ImageJ dargestellt. Dazu wurde die Membran eingescannt und als 8-bit Grafik für die Weiterbearbeitung umgewandelt. Die Motife 1 bis 7 sind in unterschiedlichen Farben dargestellt und die Signalstärken der ermittelten Pixeldichte in den vertikalen schwarzen Rechtecken dargestellt. Zur Orientierung befindet sich auf der Abszisse die Position in der 141 AS Sequenz des Motifs.

Um die Position der Motife 1 - 7 räumlich darzustellen wurde die Visualisierungs-Software PyMol genutzt. Anhand der hinterlegten Kristallstruktur der Eno (Ehinger *et al.*, 2004) ließ sie die Position der Motife im Homodimer und auch im Homooktamer darstellen (Abbildung 4-11 A+B). Dieses entspricht dem natürlichen Multimerisierungszustand der Pneumokokken Eno (Ehinger *et al.*, 2004). Die sieben Bindungs-Motife sind farblich hervorgehoben und entsprechend den in der densitometrischen Auswertung gewählten Farben (Abbildung 4-10 B). In Abbildung 4-11 sind die VWF-Interaktions-Motife zuerst im Homodimer (A) in den entsprechenden Farben dargestellt. Das Interaktionspeptid Nr. 3 wurde hierbei um die sich noch im Motif Nr.3 befindenden AS in orange ergänzt (doppelter Kasten in Motif Nr.3, Abbildung 4-10 B). Zusätzlich wurde in Schwarz die Plasminogenbindungsstelle dargestellt, die schon

bestätigt und näher charakterisiert wurde (Bergmann *et al.* 2004, 2009). Ebenso ist auch das ringförmige Homooktamer dargestellt (Abbildung 4-11 B), was dem natürlichen Multimerisierungszustand der Pneumokokken Eno entspricht (Ehinger *et al.*, 2004). Die Darstellung erfolgte mit der Software PyMol.

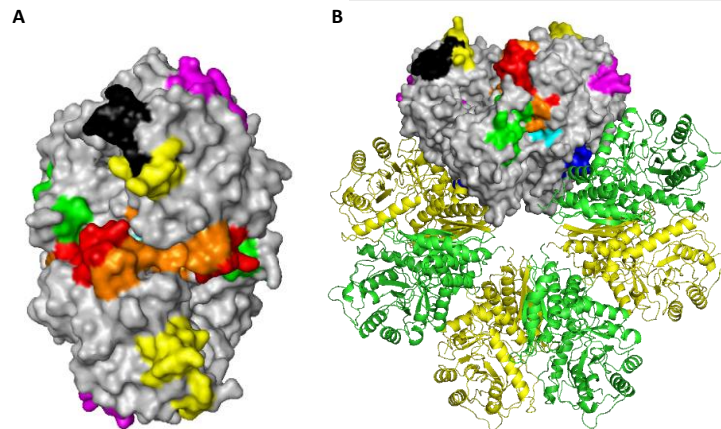


Abbildung 4-11: Position der sieben ermittelten putativen VWF-Bindungsmotive und des Plasminogen-Bindungsmotives im Enolase-Homodimer und Homooktamer

In (A) ist die Draufsicht auf das Eno-Homodimer dargestellt, sowie in unterschiedlichen Farben die putativen VWF-Bindungsmotive und in schwarz das Bindungsmotif der Eno für Plasminogen. Dabei ist das Interaktions-Peptid Nr.3 in rot und das Motif Nr. 3 in rot/orange dargestellt. Die Motife Nr. 3 von zwei Eno-Monomeren bilden einen zusammenhängenden Bereich an der Oberfläche des Homo-Dimers. Es wurde eine oberflächenbasierte Darstellung in PyMol gewählt. In (B) ist das Homo-Oktamer der Eno dargestellt. Die Eno-Monomere sind dabei mit ihren Sekundärstruktur-Motiven dargestellt und abwechselnd in grün und gelb. Dabei wurde ein Homo-Dimer analog zu (A) in einer oberflächenbasierten Darstellung angezeigt mit den sieben putativen VWF-Bindemotiven in unterschiedlichen Farben, entsprechend den in der densitometrischen Auswertung gewählten. Das Plasminogenmotif in Schwarz überlagert sich dabei mit dem putativen VWF-Bindungsmotif Nr.4 in Gelb. Das Bindungsmotif Nr. 3 in rot/orange befindet sich an der Oberfläche im Übergang zwischen zwei Eno-Monomeren. Das Motif Nr. 5 in Lila befindet sich ebenfalls an der Oberfläche. Die restlichen Motife 1, 2, 6 und 7 sind nur partiell oder nicht an der Oberfläche der Eno lokalisiert. Beide Darstellungen wurden mit der aufgelösten Kristallstruktur der Eno aus Ehinger *et al.*, 2004 erstellt.

Es stellte sich heraus, dass von den Motifen 1 in grün, 3 in rot/orange und 6 dunkelgrün nur das Motif 3 soweit auf der Oberfläche exponiert ist, dass es für eine Interaktion mit dem VWF in Frage kommt und ebenso die Kriterien für ein charakteristisches Interaktions-Signal erfüllt. Als Vergleich für eine bestätigte Interaktion diente hierbei das in Schwarz dargestellte Motif der Plasminogenbindungsdomäne. Zudem formen zwei Motife Nr.3, die benachbart liegen bei einem Eno-Homodimer eine Bindungstasche (Abbildung 4-11 A, in Rot das Interaktions-Peptid, in orange die C- und N-terminale Erweiterung auf das gesamte Motif). Es konnte außerdem festgestellt werden, dass die Plasminogenbindungsstelle und der putative VWF-Bindungsbereich des Motif Nr.3 sich räumlich nicht zu nah sind und somit theoretisch auch keine Blockierung der Bindungsstellen stattfinden sollte, sobald entweder Plasminogen oder der VWF gebunden wird. Das Peptid Nr. 4 liegt mit seinen zwei positiven Spots in dem

Plasminogenbindungsmotif. Bedingt durch die Größe des VWF Moleküls standen leider keine Strukturinformationen bezüglich der Kristallstruktur des ganzen VWF zur Verfügung.

Zusammenfassend konnte mit der Eno-Spot-Membran ein putatives VWF-Bindungspeptid, das Peptid Nr. 3 identifiziert werden, was in der Struktur des Homodimers eine Bindungstasche formt, die räumlich zugänglich erscheint.

4.1.6. Identifizierung der Eno-Bindungsdomäne des VWF

Nach der Identifizierung eines potenziellen VWF-Bindungspeptids der Eno mit dem Motif Nr.3, sollte die Interaktionsdomäne des VWF mit der Eno näher eingegrenzt werden. Dazu wurden die VWF-A-Domänen, A1, A2 und A3 auf eine Interaktion mit der Eno hin analysiert. Diese wurden von einem Kooperationspartner (Prof. Dr. Reinhard Schneppenheim aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) rekombinant exprimiert in HEK293-Zellen und aufgereinigt zur Verfügung gestellt. Die A-Domänen, A1, A2 und A3, sowie der genutzte VWF wurden zuerst auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und nach der Auftrennung einer Coomassie Färbung unterzogen (Abbildung 4-12). Hierbei waren aufgrund der theoretischen Berechnung des Molekulargewichts für die A1 eine Bande bei ca. 26 kDa, für die A2 eine Bande bei ca. 24 kDa und für die A3 eine Bande bei ca. 21 kDa zu erwarten gewesen.

Lediglich die aufgetragene Protein-Lösung der A3-Domäne lag in der erwarteten relativen Molekulargewichtsgröße mit einer Bande bei ca. 26 kDa vor. Die A1 und die A2 Domäne wiesen beide mit einer Bande bei ca. 40 kDa und bei der A2 mit einer Doppelbande bei ca. 35 kDa ein unerwartet hohes Molekulargewicht auf. Dies befand sich ungefähr bei der doppelten erwarteten Höhe. Es ist nicht auszuschließen, dass dies auf eine Dimerisierung zurückzuführen ist. Die Proteinlösungen der A1- und A3-Domänen zeigen keine Degradationsereignisse. Alle Proteinlösungen bestehen bis auf die A2-Lösung aus nur einem Protein und sind somit für Molekularbiologische-Analysen geeignet. Dies gilt bedingt auch für die Lösung der A2-Domäne, wobei diese sehr degradationsanfällig ist.

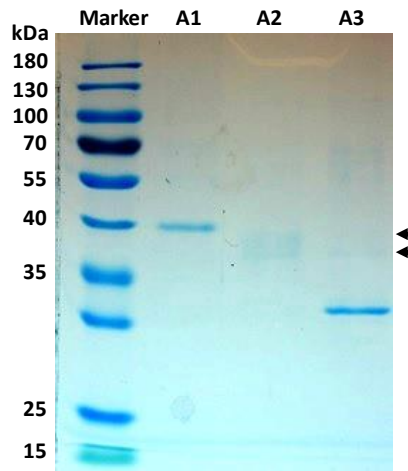


Abbildung 4-12: Qualitätskontrolle der VWF-A Domänen nach SDS-Gelelektrophorese und Commassie-Blue-Färbung

Die Proteinbande der A1-Domäne befand sich auf Höhe der 40 kDa Markerbande und die Proteinbande der A2-Domäne wurde als schwache Doppelbande auf der Höhe von 38 kDa und 36 kDa detektiert (schwarze Pfeile). Die A3-Proteinbande wurde auf Höhe der 26 kDa Markerbande detektiert. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Zur Analyse der Interaktion zwischen der Eno und der A-Domänen des VWF wurde die aufgereinigten Proteine der A-Domänen in einer Konzentrationsreihe von 1 µg bis 0,125 µg aufgetragen auf eine Nitrocellulosemembran und mit 20 µg enthaltenen Eno-Lösung inkubiert ü.N. Als Kontrollen wurde zusätzlich der VWF von und die Eno mit aufgetragen. Der Nachweis einer Bindung der Eno erfolgte über einen Eno-spezifischen Primär- und einen Sekundär-Antikörper, der eine gekoppelt AP hatte. Das Ergebnis der Immundetektion ist in Abbildung 4-13 zu sehen. Die A2-Domäne zeigt kein Interaktionssignal in der Eno-Überlagerungs-Membran (Abbildung 4-13 A). Die auf das Referenz-Coomassie Gel aufgetragenen Mengen an Proteinen zeigen jedoch, dass die A2 in leicht verringerter Konzentration vorlag im Vergleich zur A1- und A3-Domäne (Abbildung 4-12). Dies ist wahrscheinlich auf die schnellere Degradierung der A2-Domäne zurückzuführen. Jedoch wäre auch bei der verringerten Konzentration ein leichtes Signal bei einer Menge von 1 µg Protein zu erwarten gewesen, wenn eine Bindung der Eno stattgefunden hätte. Hingegen sind bei der A1-Domäne ein stärkeres Signal und bei der A3 ein etwas schwächeres Signal zu erkennen. Die Bindungssignale der A1- und A3-Domäne erhöhen sich in ihrer Intensität konzentrationsabhängig. Dies ist charakteristisch für eine spezifische Interaktion. Bei beiden Domänen ist noch ein schwaches Signal bei 0,5 µg Protein zu erkennen.

Die positive Kontrolle der Eno, sowie die Kontrolle mit dem VWF zeigen eine spezifische Interaktion mit dem Primär- und Sekundär-Antikörper (Abbildung 4-13 A). Die in Abbildung

4-13 B dargestellte Negativkontroll-Membran wurde nicht mit Eno-Lösung inkubiert, jedoch mit dem Primär- und Sekundär-Antikörpern. Es tritt ein starkes Signal bei der Eno und nur einen leichten Hintergrund bei dem 1 µg Spot der A1 und A3 Domänen auf, was die Spezifität der Antikörper für die Eno nachweist.

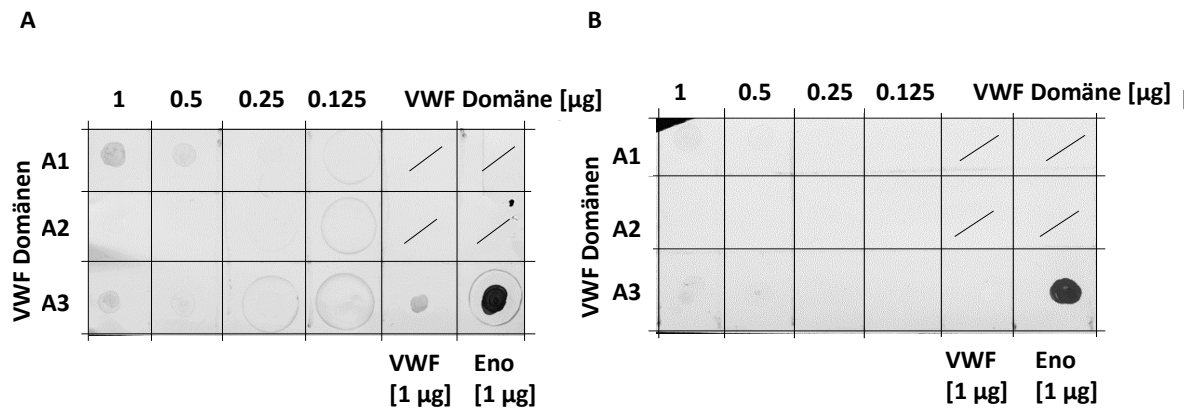


Abbildung 4-13: Identifikation der mit der Pneumokokken-Eno interagierenden VWF-A-Domänen

In (A) und (B) wurden jeweils die VWF-A-Domänen A1, A2 und A3 in den Mengen 0,125; 0,25; 0,5 und 1 µg auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen, sowie 1 µg VWF und Eno als Kontrollen. (A) wurde nach dem Auftragen der A-Domänen mit 20 µg Eno-Lösung inkubiert ü.N. Beide Membranen, (A) und (B) wurden mit dem anti-Eno-Primär-Antikörper und einen gegen den F_C-Teil des Primär-Antikörpers gerichteten Sekundär-Antikörper gegen Kaninchen inkubiert, an welchen für die Detektion eine AP gekoppelt war. In der Eno-Überlagerung (A) ist eine Interaktion mit der Eno mit der A1- und der A2-Domäne des VWF zu erkennen, sowie mit dem ganzen VWF. Die aufgetragene Eno, die als Positiv-Kontrolle für die Antikörper-Inkubation diente, wurde sowohl in (A) als auch in (B) erkannt.

Mit der densitometrischen Auswertung (Abbildung 4-14) wurde die Intensität der qualitativen Färbreaktion quantifizierbar und zeigte bei der A1 mit einem Wert von ca. 8% eine stärkere Färbreaktion/Bindung, als die A3-Domäne mit ca. 4% bei einer gleichen Menge von 1 µg Protein. Ebenfalls zu 1 µg aufgetragen, ergab sich hier für den VWF ein Wert von 13% und für die rekombinante Eno, als Positivkontrolle ein Wert von 25% der sich auf die gesamte Fläche des Quadrates bezieht.

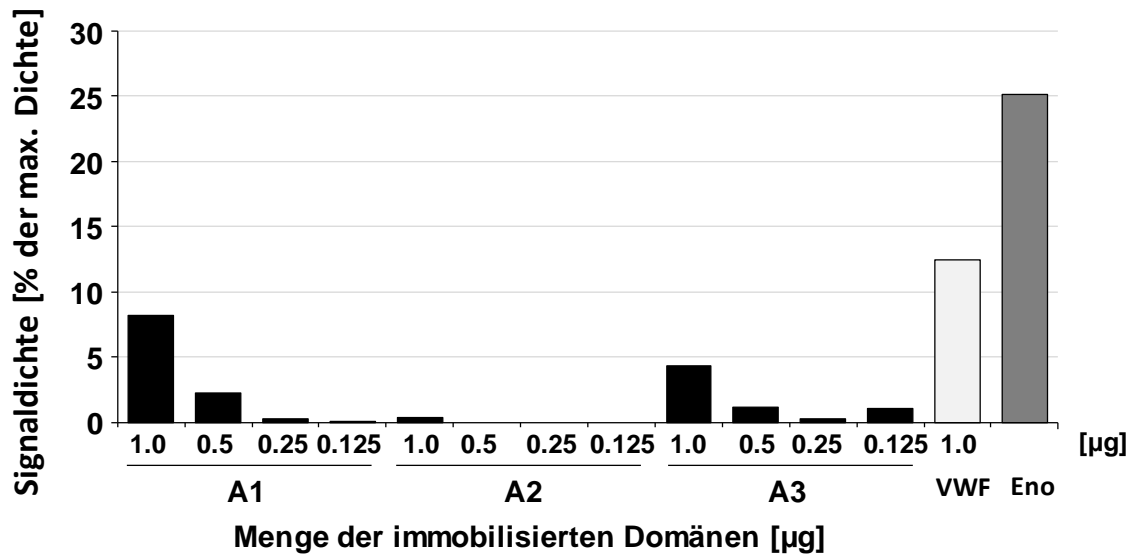


Abbildung 4-14: Densitometrische Analyse der Interaktion der VWF-A-Domänen mit der Eno

Für die densitometrische Analyse wurde die Eno-Überlagerungsmembran eingescannt und für die Bearbeitung in ImageJ in ein 8-Bit-Format umgewandelt. Im Anschluss wurde der Antikörper-Hintergrund von den ermittelten Signaldichten in % abgezogen. Dargestellt sind die Signaldichten der A-Domänen in den Konzentrationen von 1 bis 0,125 µg, sowie als Vergleich die Signaldichte des ganzen VWF und die der aufgetragenen Eno als Positivkontrolle.

Somit kann postuliert werden, dass die Eno bei einem Vergleich der A-Domänen hauptsächlich mit der A1- und der A3-Domäne des VWF interagiert.

Im Folgenden wurde für die Bindungsmessungen in der SPR die VWF-A-Domänen eingesetzt. Durch die Messung der Bindungsstärke in der SPR sollte eine Aussage über die Bindung zwischen der Eno und den A-Domänen des VWF getroffen werden. Dabei wurde analog zu der Messung des VWF in Kapitele 3.2.13 verfahren. Die Eno wurde als Ligand an den Chip immobilisiert und die A1- bis A3-Domänen als Analyt eingesetzt. Für jede Domäne wurde eine Konzentrationsreihe von 0,0612; 0,125; 0,25; 0,5; und 1,0 µg/mL für die Messung eingesetzt bei einer Flussgeschwindigkeit von 10 µL/min. Die Bindungsfähigkeit des Liganden wurde durch 2 mM NaOH wiederhergestellt und der Assay in drei unabhängigen Messungen wiederholt. Die Rohdaten der Bindungskinetik Parameter, Gleichgewichts Affinitäts-Bedingungen sowie die χ^2 -Werte (siehe Anhang) wurden in der BIAcore T200 Software Version 3.0 ausgewertet. Die Sensogramme der A1-, A2-, und A3-Domänen sind in Abbildung 4-15 dargestellt. Bei der weiterführenden Analyse der VWF A-Domänen zeigt sich nur bei der A1-Domäne eine messbare Dissoziationskonstante von $2,16 \times 10^{-8}$ M. Mit der Maximalkonzentration von 1 µg/mL der A1-Domäne wurde und so nur RU-Werte knapp über 50 erreicht wurden (Abbildung 4-15 A). Es zeigte sich ein klarer Unterschied zu der A2- und

A3-Domäne, bei der nur RU Werte von ca. 5 erreicht wurden, bei einer verwendeten Konzentration von 1 µg/mL (Abbildung 4-15 B).

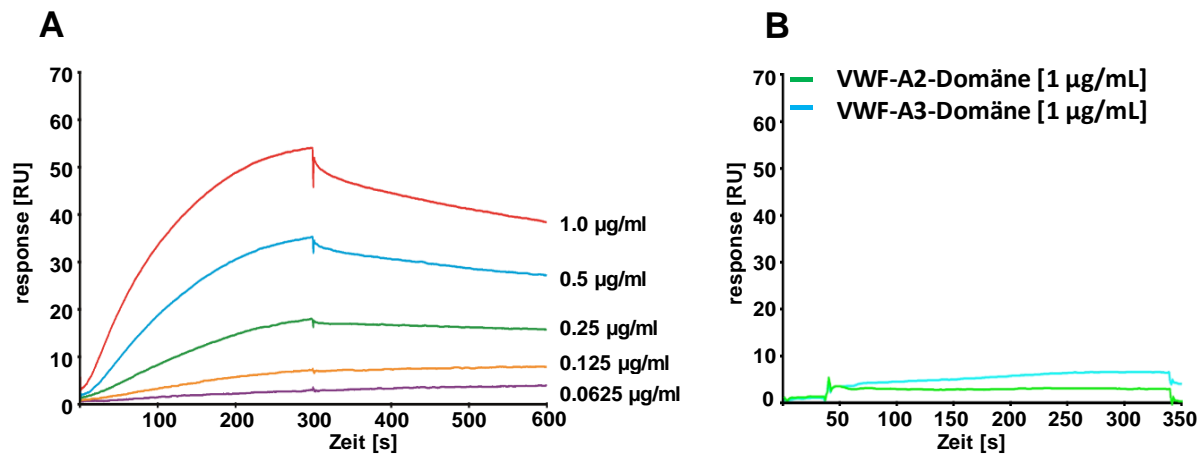


Abbildung 4-15: Ergebnis-Sensogramme der SPR-Analyse zur A-Domänen-Eno-Bindungskinetik

Dargestellt sind die aufgenommenen Sensogramme der Interaktionsmessung der Eno mit Domänen A1, A2 und A3. In (A) ist das Sensogramm für die A1-Domäne als Analyt in Konzentration von 0,0625 µg/mL bis 1 µg/mL dargestellt bei Einsatz der Eno an einen Biacore CM5 Sensor Chip als Ligand. In (B) ist ein kombiniertes Sensogramm für die A2- und die A3-Domäne des VWF als Analyt in einer Konzentration von 1 µg/mL und der Eno als Ligand dargestellt. Es konnten in (B) keine starken Bindungen der Eno an die A2- und A3-Domäne des VWF festgestellt werden. In (A) konnte für die A1-Domäne mit einem RU von knapp über 50 eine Kinetik ermittelt werden, die einem K_d von $2,41 \times 10^{-8}$ M entspricht bei einem χ^2 -Wert von 1,57. Es wurden für alle Domänen drei unabhängige Versuche durchgeführt bei einer Flussrate von 10 µL/min. Die Bindungsanalysen wurden in PBS (pH 7,4) mit 0,05 % Tween 20 bei 25°C und einer Flussrate von 10 µL/min durchgeführt und mit der BIAcore T200 Software Version 3.0 ausgewertet von Dr. Thomas Kohler, AG-Hammerschmidt, Universität Greifswald.

Die Ergebnisse der SPR-Analyse bestätigen die Interaktion zwischen der Enolase und der A1-Domäne des VWF.

4.2. Infektionsversuche unter dem Einfluss einer VWF Präinkubation von Pneumokokken mit humanen Zellen

Nachdem biochemisch sowohl die Bindung von VWF an die rekombinant exprimierte Pneumokokken Eno nachgewiesen werden konnte, als auch für die Bindung relevante Bereiche und ermittelt werden konnten bei Eno und dem VWF, sollte im Folgenden der Effekt auf die Zellkulturinfektionen getestet werden. Zuerst wurde der Einfluss der Präinkubation der Pneumokokken mit dem VWF im Vergleich zu nicht präinkubiert Pneumokokken getestet. Dies erfolgte in der Infektion mit THP-1 makrophagenähnlichen Zellen und dem Endothel-Zell-Modellsystem der Nabelschnur Endothelzellen (HUVECs). Dadurch sollte ermittelt werden, ob eine VWF-Präinkubation der Pneumokokken einen Einfluss auf das Phagozytoseverhalten der

THP-1 Zellen hat. Ob die Präinkubation zudem einen Einfluss auf die Adhärenz und Internalisierung der Pneumokokken hat, sollte in statischen Infektionsversuchen mit HUVECs ermittelt werden. Im Anschluss wurde potenziellen Bindungsmodulatoren getestet, ob diese die Interaktion zwischen VWF und Eno beeinflussen. Darauffolgend sollte der Einfluss von VWF bei der Bindung von Pneumokokken auf HUVECs in einem Mikrofluidic-Flusskultivierungssystem getestet werden bei einem physiologischen Scherstress von 10 dyn/cm². Dies ermöglicht nicht nur die Kultivierung der HUVECs in einem konstanten Scherstress, sodass sich eine gefäßähnliche Morphologie der Zellen einstellte. Es ermöglicht zudem die Bedingungen im Blut während einer Sepsis in einem ersten Ansatz physiologischer nachzustellen, als es in einem statischen Versuch möglich ist. Der VWF ist ein mechanosensitives Protein und einige Bereiche, wie die A2-Domäne, verändert ihre Konformation unter Scherstress wodurch andere Bindungsstellen erst zugänglich werden. Abschließend erfolgte die Untersuchung auf den Einfluss für die Infektion im *in vivo* Modell Zebrafisch und eine erste Beurteilung bezüglich der Beeinflussung der Überlebesrate durch eine VWF-Präinkubation der Pneumokokken.

4.2.1. Einfluss einer Pneumokokken-VWF-Präinkubation auf die Phagozytose von THP-1-Makrophagen

Die Ergebnisse der biochemischen Analysen bestätigten die Eno-vermittelte VWF-Bindung an die Oberfläche von Pneumokokken. Mit dem Ziel festzustellen, ob die Ummantelung der Pneumokokken mit humanem VWF vor einer Erkennung und Phagozytose durch professionelle Makrophagen schützt oder einen anderen Einfluss auf die Phagozytose hat bei THP-1 makrophagenähnlichen Zellen wurden Phagozytose-Assays durchgeführt.

Nach einer PMA-induzierten Differenzierungskultivierung werden THP-1 Zellen als Makrophagen-Modellsystem zur Überprüfung von Phagozytose-Aktivitäten genutzt. Die Durchführung erfolgt wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben. Zur Bestimmung des Einflusses von VWF auf die Phagozytose-Aktivität wurden THP-1 Zellen mit Pneumokokken des Serotyps 35A infiziert, die mit VWF-präinkubiert worden waren. Nach der Infektion wurden die adhärenenten Bakterien durch Antibiotikabehandlung inaktiviert und entfernt und die Anzahl phagozytierter Bakterien durch Bestimmung der KBE auf Festmedien ermittelt. Zur Normalisierung der Phagozytose-Raten untereinander wurde die Phagozytose Rate von *E. coli* K12 parallel ermittelt. Die Bestimmung der Phagozytose-Rate der *E. coli* K 12-Bakterien

ermöglichte eine Standardisierung der Phagozytose-Versuche mit den ermittelten Raten für die Pneumokokken. Die Ergebnisse der Versuchsvariante A, die auf einer Auszählung der phagozytierten KBE basiert, sowie die Ergebnisse der Variante B, die durch das Auszählen adhärenter und phagozytierter Bakterien nach mikroskopischer Visualisierung beobachtet wurden, sind in Abbildung 4-16 dargestellt. Die Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017 erzielt.

Sowohl die Ermittlung der KBE der phagozytierter Bakterien (Variante A), als auch die mikroskopische Quantifizierung der intrazellulären, phagozytierten, sowie der extrazellulären, adhärenter Bakterien zeigt eine deutliche Steigerung der Adhärenz und der Phagozytose von VWF-präinkubiert Pneumokokken (Abbildung 4-16). Die Anzahl an phagozytierten Pneumokokken steigt durch VWF-Präinkubation signifikant von $1,2 \times 10^5 \pm 0,14$ auf $1,9 \times 10^5 \pm 0,23$ Bakterien/Zelle an. (Abbildung 4-16). Für die visuelle Auswertung wurde von jeder Bedingung 150 Zellen ausgezählt und diese jeweils in Gruppen zu 50 Zellen dargestellt. Dabei ergab sich eine signifikante Steigerung der Phagozytose-Rate von VWF-präinkubiert Pneumokokken von $13,8 \pm 1,8$ Bakterien pro Zelle ohne VWF-Präinkubation auf $31,6 \pm 2,3$ Pneumokokken/Makrophage mit einer VWF-Präinkubation (Abbildung 4-16 B). Die Erhöhung der Anzahl intrazellulärer Bakterien entspricht mehr als einer Verdopplung der phagozytierten Pneumokokken.

Die Anzahl extrazellulärer, an THP-1 adhätender Bakterien ist nach VWF-Präinkubation von $10,1 \pm 1,2$ Bakterien pro Zelle ohne Präinkubation auf $14,1 \pm 1,8$ Pneumokokken/Zelle etwas erhöht. Diese Erhöhung ist jedoch nicht signifikant (Abbildung 4-16).

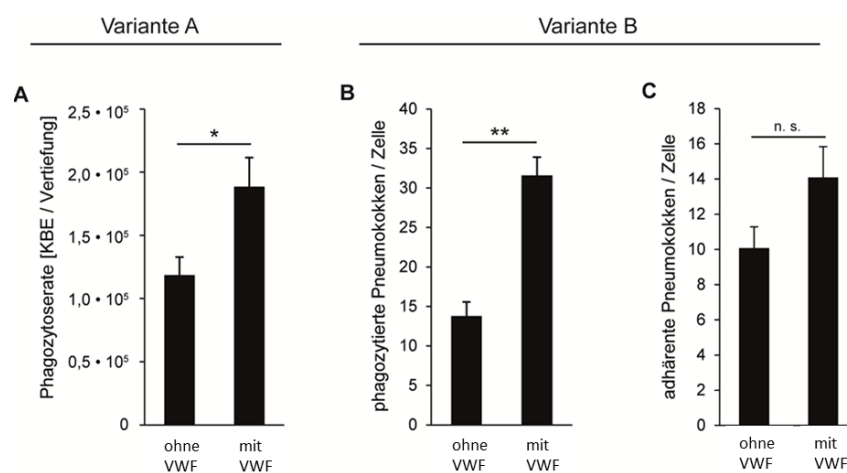


Abbildung 4-16: Bestimmung der THP-1 Phagozytoserate von Pneumokokken

(A) zeigt die Phagozytose-Rate der THP-1 Makrophagen von *S. pneumoniae* SP19 mit und ohne vWF-Vorinkubation. Mit Variante A wird die Ermittlung der Anzahl noch lebender phagozytierter Pneumokokken durch KBE-Bestimmung nach Antibiotika-vermitteltem Abtöten extrazellulärer Bakterien bezeichnet. Die KBE wurden für eine Vertiefung der 24-Well-Platte bestimmt, in die bei Versuchsbeginn etwa 2×10^5 THP-1 Zellen ausgesät wurden. Ausplattiert wurden Verdünnungsreihen nach Lyse der THP-1 Makrophagen. $*P < 0,005$. Die Abbildungen (B) und (C) zeigen Ergebnisse nach Variante B, die durch eine mikroskopische Quantifizierung nach DIF gewonnen wurden. (B) Darstellung der phagozytierten Pneumokokken pro THP-1 Makrophagen. Pro Bedingung wurden 150 Zellen aus drei Ansätzen (je 50 Zellen) mit dem Laser Scanning Mikroskop Leica DMI8 ausgezählt. $**P < 0,001$ (C) Darstellung der adhärenenten Pneumokokken pro THP-1 Makrophagen. Für die Darstellung der phagozytierten und adhärenenten Pneumokokken pro Zelle wurden dieselben Zellen ausgewertet. n. s. = nicht signifikant. Abbildung aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

In Abbildung 4-17 sind exemplarisch Bildausschnitte von dem Phagozytose-Versuchen mit und ohne VWF-Präinkubation gezeigt. Es wird auch hier deutlich, dass die Anzahl phagozytierten Pneumokokken nach einer Präinkubation mit VWF höher ist, als ohne Präinkubation. Dieses Ergebnis ist auch in der Ausschnittsvergrößerung deutlich erkennbar (Abbildung 4-17 D ohne VWF und H mit $3 \mu\text{g/mL}$ VWF). In der Überlagerungsdarstellung ist die intakte Zellmorphologie der THP1-Zellen durch eine Phalloidin-vermittelte blaue Fluoreszenz des Aktin-Zytoskeletts zu erkennen (Abbildung 4-17).

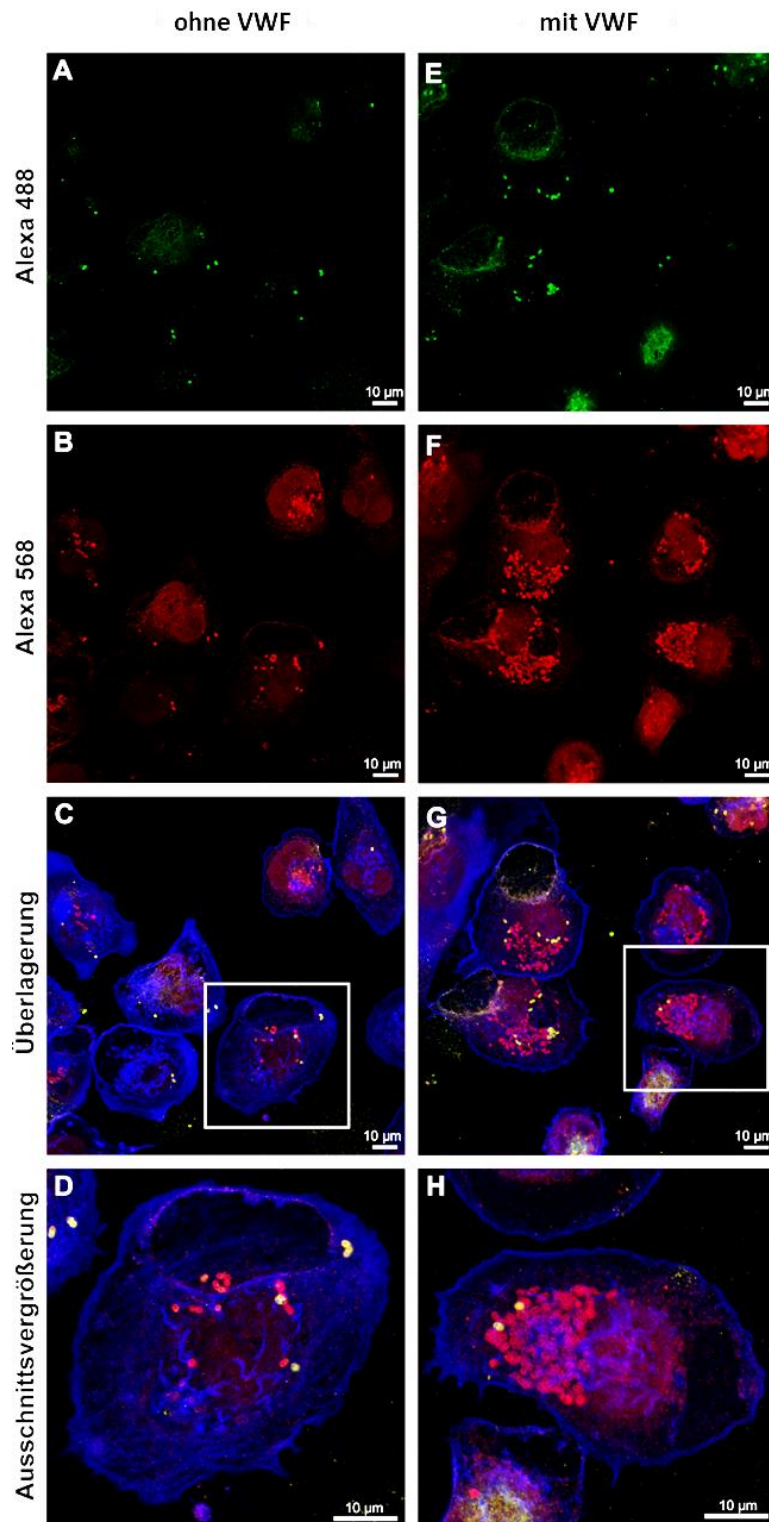


Abbildung 4-17: Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen des THP-1 Phagozytoseassays

(A-C) und (E-G) zeigen je einen Bildausschnitt ohne VWF und mit VWF-Präinkubation der Pneumokokken. In den Aufnahmen (D+H) sind vergrößerte Ausschnitte repräsentativer Zellen dargestellt. (A+E) zeigen jeweils Aufnahmen bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm, (B+F) bei 552 nm. In (C+G) ist das Überlagerungsbild mit Darstellung des Aktin-Zytoskeletts durch Phalloidin-Einlagerung bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm zu sehen. Die Fluoreszenzdetektion resultierte in einer gelben Darstellung der adhärenenten Pneumokokken als ringförmige Diplokokken. Phagozytierte, intakte Bakterien fluoreszieren rot und das Zytoskelett erscheint in blau. Die Aufnahmen wurden mit dem 63x Ölimmersionsobjektiv des Laser Scanning Mikroskop Leica DMI8 erstellt. Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Abbildung aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

Die Ergebnisse der Phagozytose-Analysen belegen eine VWF-vermittelte signifikante Erhöhung der Phagozytose Rate von Pneumokokken.

4.3. Zellkulturinfektionsstudien zur Analyse der Funktion des VWF auf die zelluläre Adhärenz und Internalisierung von Pneumokokken

Die Ergebnisse der biochemischen Analysen bestätigten die Eno-vermittelte VWF-Bindung an der Oberfläche von Pneumokokken. Um die funktionellen Auswirkungen dieser Interaktion für die Adhärenz von Pneumokokken an humane Zellen untersuchen zu können, wurden Zellkulturinfektionen mit humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) durchgeführt. Diese Zellen sind für die wissenschaftliche Fragestellung sehr geeignet, da sie die physiologischen Charakteristika von Gefäßendothelzellen aufweisen und VWF-enthaltene WPB ausbilden (Lüttge M., Dissertation 2011). Die Effekte des VWF auf die bakterielle Adhärenz und die Internalisierung in humane Endothelzellen wurden nach der Infektion durch immunmikroskopische Visualisierung und Quantifizierung analysiert. Zudem wurden verschiedene Bindungsmodulatoren in die Zellkulturanalysen einbezogen, um die VWF-vermittelte Adhärenz näher zu charakterisieren. Um die im Scherstress des Blutstroms auftretenden Konformations- und Funktionsänderungen des VWF in der Interaktion mit den Bakterien in den Adhärenz Studien berücksichtigen zu können, wurde ein Mikrofluidiksystem zur Simulation des Blutstroms etabliert.

4.3.1. Einfluss der VWF-Präinkubation auf die bakterielle Adhärenz und Internalisierung in der statischen Zellkultur von Endothelzellen

Die Zellkulturinfektionsanalyse mit humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) diente zur Untersuchung der Funktion von VWF in der Pneumokokken-Adhärenz und einer möglichen nachfolgenden Internalisierung. Die Analysen wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Karen Lahme unter meiner Anleitung durchgeführt. Die Infektion, der bis zur Subkonfluenz kultivierten Zellen erfolgte mit Serotyp 35A Pneumokokken, der sich aufgrund seiner geringen Bekapselung in vergleichbaren Studien als geeigneter Laborstamm bewährt hat (Bergamnn *et al.*, 2009; 2012). Die Infektion erfolgte für 3 h und wurde nach dem Entfernen nicht-gebundener Bakterien für eine weitere Stunde verlängert, um mögliche Internalisierungsprozesse zu ermöglichen. Die Zellen wurden zuvor mit VWF-Konzentrationen von 0,1 µg/mL, 1,0 µg/mL und 10 µg/mL präinkubiert, so dass die Analysen im Bereich der

bei gesunden Menschen vorliegenden VWF- Konzentration von 5-10 $\mu\text{g/mL}$ erfolgten (Mannucci, 1998). Zur Kontrolle wurden HUVECs ohne VWF Präinkubation infiziert. Nach Fixierung der Proben erfolgte mit Pneumokokken-spezifischen Primärantikörpern und mit zwei verschiedenen Fluorophoren-konjugierten Sekundär-Antikörpern die Differenzielle Immunfluoreszenz-Färbung (DIF). Diese Detektionstechnik ermöglicht die fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung von internalisierten Bakterien, die in Rot fluoreszieren von adhärenenten Bakterien, die durch Farbüberlagerung in Gelb erscheinen. Die Anzahl der an der Endothelzelloberfläche adhärierenden Bakterien nimmt mit Zunahme der präinkubierten VWF-Konzentration von $16,1 \pm 3,9$ Bakterien pro Endothelzelle ohne VWF-Präinkubation auf $37,5 \pm 5,1$ Bakterien pro Endothelzelle nach Präinkubation mit 10 $\mu\text{g/mL}$ VWF signifikant zu (Abbildung 4-18 A).

Bei einem direkten Vergleich einer Infektion, bei der entweder die HUVECs oder die Pneumokokken mit oder ohne 3 $\mu\text{g/mL}$ VWF-präinkubiert wurden, zeigt sich in beiden Fällen eine Steigerung der adhärenenten Pneumokokken (Abbildung 4-18 B). Das Verhältnis der Steigerung ist in beiden Fällen vergleichbar, jedoch liegt die Anzahl adhärenenter Pneumokokken im Falle der Präinkubation der Pneumokokken mit 3 $\mu\text{g/mL}$ VWF mit ca. 44 Pneumokokken/HUVEC höher, als die im Falle der mit 3 $\mu\text{g/mL}$ präinkubiert HUVEC mit ca. 33 Pneumokokken/HUVEC. Während dessen standen die Pneumokokken im Ansatz mit und ohne VWF-Präinkubation nach dem Einstellen der OD_{600} auf 1×10^9 KBE/mL für 1h bei 37°C und wurden dann erst auf die Infektions OD_{600} von 2×10^8 eingestellt und zu den HUVECs gegeben. Die Erhöhung der Anzahl der adhärenenten in gelb fluoreszierenden Bakterien wird in Abbildung 4-18 C mit Erhöhung der VWF-Konzentration exemplarisch dargestellt. In den Aufnahmen sind die humanen Zellen durch die unspezifische Hintergrundfluoreszenz des Alexa-568-konjugierten Antikörpers rötlich gefärbt. Diese Hintergrundfluoreszenz lässt erkennen, dass die Zellmorphologie der HUVEC trotz der hohen Bakterienadhärenz nach Präinkubation mit 10 $\mu\text{g/mL}$ VWF intakt bleibt und nicht maßgeblich durch eine Pneumolysin-vermittelte Lyse verändert ist (Abbildung 4-18 C). Die Quantifizierung der internalisierten Pneumokokken hat ergeben, dass im rechnerischen Mittel nur ca. 0,1 Bakterien pro Zelle internalisieren und die VWF-Präinkubation keine Auswirkung auf die Internalisierungsrate hat (Daten im Anhang dargestellt). Die weißen Pfeile in den Mikroskopieaufnahmen in Abbildung 4-18 C zeigen vereinzelte, in rot-fluoreszierende Pneumokokken, die in die HUVEC internalisiert sind.

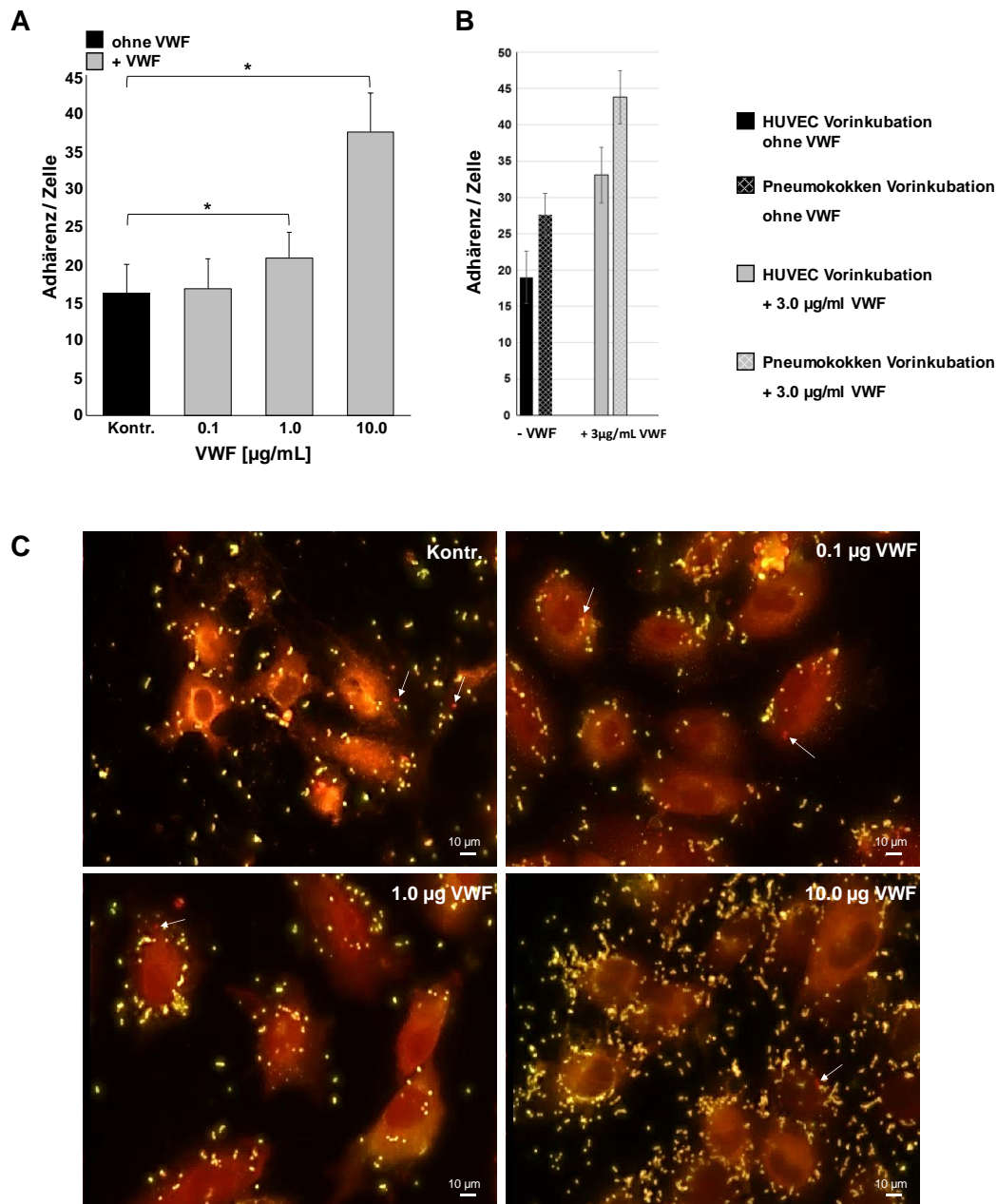


Abbildung 4-18: Effekt eine VWF-Präinkubation von Pneumokokken oder HUVECs auf die Adhärenz der Pneumokokken

In (A) ist die Anzahl an adhärenenten Pneumokokken aus der VWF-Konzentrationsreihe von 0,1 bis 10 µg/mL dargestellt verglichen zu nicht-präinkubierten Pneumokokken. Der P-Wert für das Signifikanzniveau liegt bei < 0,001 verglichen zu der Kontrolle mit 0 µg/mL VWF. In (B) wurde die Präinkubation der HUVEC und der Pneumokokken nach Präinkubation mit 3 µg/ml VWF im Vergleich zu nicht-präinkubiert Pneumokokken getestet. Anschließend wurden beide Ansätze einander gegenübergestellt. In (C) sind repräsentative Aufnahmen der adhärenenten (gelb) und internalisierten (rot) Pneumokokken dargestellt in Abhängigkeit einer steigenden VWF-Konzentration, mit denen die HUVECs inkubiert wurden. Die nicht-präinkubiert HUVEC wurden zur Infektionskontrolle eingesetzt. Zudem wurden die HUVECs mit steigender VWF-Konzentration von 0,01 µg/ml, 1,0 µg/ml und 10 µg/ml präinkubiert. Die Immundetektion adhärenenten und internalisierter Bakterien erfolgte eine DIF. Drei unabhängige Versuche wurden durchgeführt und jeweils eine Anzahl von mindestens 50 HUVECs/Versuch ausgezählt. Die weißen Pfeile in (C) zeigen rot gefärbte, internalisierte Pneumokokken. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. Abbildung aus der Bachelorarbeit von Karen Lahme, 2017. Die Einzelaufnahmen der Fluoreszenzkanäle sind im Anhang beigelegt.

Die Ergebnisse der Zellkulturinfektionsstudien lassen erkennen, dass eine Präinkubation mit physiologischen Konzentrationen an VWF zu einer signifikanten Erhöhung der Adhärenz von Pneumokokken an humane Endothelzellen führt, sowohl bei einer Präinkubation der HUVEC, also auch bei einer Präinkubation der Pneumokokken mit VWF. Im Gegensatz dazu zeigt die VWF-Präinkubation keine Auswirkung auf die bakterielle Internalisation.

4.3.2. Nähere Charakterisierung der VWF-vermittelten Adhärenz durch Inhibitionsstudien mit Bindungs-Modulatoren

Nachdem eine signifikante VWF-vermittelte Steigerung der Adhärenz von Pneumokokken an HUVECs gezeigt werden konnte, sollte dieser Effekt durch das Einbeziehen möglicher Bindungsmodulatoren näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden die in Kapitel 3.5.6 aufgeführten Modulatoren Histamin, Heparin, N-Acetylcystein, RGD- und RGE-repräsentierende Peptide, sowie die VWF-Bindungspeptide des Motif Nr.3 „short“ and „long“ eingesetzt und deren Auswirkung auf die Adhärenz im Vergleich zu der alleinigen Präinkubation mit jeweils 3 µg/mL VWF beurteilt. Die Wachstumsversuche wurden in zwei von einander unabhängigen Versuchen durchgeführt und bei den im Diagramm in Abbildung 4-19 dargestellten Werte handelt es sich um Mittelwerte der KBE nach 0, 1 und 3 h. Diese Einzelwerte wurden um eine Tendenz zu verdeutlichen miteinander verbunden.

Anhand dieses Wachstumsversuches wird eine negative Beeinträchtigung des bakteriellen Wachstums durch 3 µg/mL VWF, 200 µM/mL N-Acetylcystein und 30 sowie 120 IU Heparin/mL ECBM ausgeschlossen. Die Wachstumsanalysen wurden im Zellkulturmedium ECBM durchgeführt, da dieses Medium auch in den nachfolgenden Infektionsanalysen nach Zugabe der Bindungsmodulatoren verwendet wird. An dieser Stelle ist anzumerken, dass für keinen der eingesetzten Bindungsmodulatoren Auswirkungen auf das Kulturverhalten der Pneumokokken festgestellt werden konnte (Abbildung 4-19). Diese Analysen wurden von Karen Lahme im Rahmen ihrer Bachelorarbeit angefertigt.

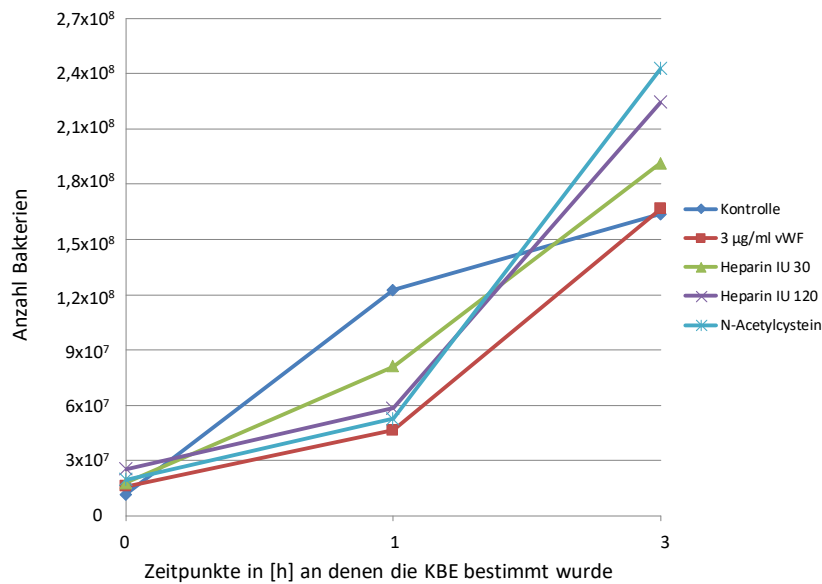


Abbildung 4-19: Einfluss von VWF und ausgewählten Bindungsmodulatoren auf die Pneumokokken Vermehrung

Dargestellt sind die ermittelten Werte der KBE nach 0, 1 und 3 h der Pneumokokken-Kultivierung des Stammes des Stammes 35A unter Einfluss von 3 µg/mL VWF, 200 µM/mL N-Acetylcystein und 30 sowie 120 IU Heparin/mL ECBM. Durch das Verbinden der Messpunkte der KBE soll eine Tendenz verdeutlicht werden. Die Pneumokokken für die Kulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,38 kultiviert und anschließend auf eine KBE von 2×10^7 /mL für die Wachstumsversuche angezogen. Die Kontrolle wurde nur in endothelial basal Medium inkubiert bei 37°C und 5% CO₂. Abbildung von Karen Lahme, 2017.

Da in den vorher präsentierten Studien kein VWF-vermittelter Effekt auf die bakterielle Internalisierung festgestellt werden konnte, wurden die Inhibitionsstudien mit den Bindungsmodulatoren auf die Bewertung der bakteriellen Adhärenz fokussiert. Die Daten zur Internalisierung wurden jedoch parallel erhoben und sind dem Anhang zu entnehmen. In vorangegangenen Studien wurde mit Histamin als Induktor der WPB-Exozytose und VWF-Sekretion eingesetzt (Lüttge *et al.*, 2012). Um zu überprüfen, ob die VWF-vermittelte Adhärenz durch die Stimulation der VWF-Ausschüttung mit Histamin noch weiter gesteigert werden kann, erfolgte die Infektion nach Zugabe von 1 mM Histamin. Die immunfluoreszenzbasierte Quantifizierung der Anzahl adhärenter Bakterien ohne VWF-Präinkubation ergab eine geringe, nicht-signifikante Steigerung der Adhärenz von $19,01 \pm 3,6$ Bakterien/Zelle auf $22,8 \pm 3,5$ Bakterien pro Zelle im Vergleich zur Kontrolle, die mit 5×10^{-5} mM Histamin inkubiert wurden (Abbildung 4 20, schwarzer Balken). Die adhärenenten Bakterien erscheinen in Gelb (Abbildung 4-21). Die rote Hintergrundfärbung der Zellkörper verdeutlicht, dass die Zellmorphologie im Verlauf der Infektionen intakt bleibt, so dass keine stressbedingten zellulären Ergebnisartefakte berücksichtigt werden müssen. Eine Vergleichbare geringe Steigerung ergab sich auch bei den Ansätzen mit einer VWF-Präinkubation kombiniert mit 5×10^{-5} mM Histamin (Abbildung 4 20, grauer Balken). Als weitere Komponente wurde Heparin getestet. Heparin ist ein

Gerinnungshemmer, der von VWF in der A1-Domäne gebunden wird (Sobel *et al.*, 1991). In den Infektionsstudien wurde dieser Modulator in zwei verschiedenen Konzentrationen (30 IU und 120 IU Heparin) eingesetzt, um einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der Heparin-Bindungsdomäne des VWF an der VWF-vermittelten Adhärenz aufzuzeigen. In den Infektionsstudien ohne VWF zeigt die Zugabe von Heparin keinen Effekt auf die Adhärenz der Pneumokokken an HUVEC. Die Bakterienzahl von $18,3 \pm 3,0$ Bakterien pro Zelle bei 30 IU Heparin und von $18,1 \pm 3,6$ Bakterien pro Zelle bei 120 IU Heparin liegt im Bereich der Kontrolle von $19,0 \pm 3,6$ Bakterien /Zelle ohne VWF und ohne Heparin (Abbildung 4 20, schwarzer Balken). Im Gegensatz dazu reduziert die Zugabe von Heparin bereits in der geringeren Konzentration von 30 IU, aber auch in der höheren Konzentration von 120 IU die VWF-vermittelte Adhärenz in signifikanter Weise von $33,08 \pm 3,8$ Bakterien pro Zelle bei der Kontrolle auf $24,7 \pm 2,8$ Bakterien pro Zelle bei 30 IU Heparin und $21,6 \pm 3,9$ Bakterien pro Zelle bei 120 IU Heparin (Abbildung 4 20, grauer Balken). Die visuelle Betrachtung der Bakterienadhärenz in der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt die deutliche Abnahme der Bakterienadhärenz an HUVEC in Gegenwart von Heparin (Abbildung 4-21 B, verglichen mit F (30 IU) und H (120 IU)). Hierbei ist jedoch anzumerken, dass es durch Heparin auch ohne VWF-Zugabe zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Bildung von Bakterienaggregaten kommt (Abbildung 4-21 A, verglichen mit E (30 IU) und G (120 IU)), die sich auf die absolute Quantifizierung der Anzahl adhärenter Bakterien pro Zelle auswirken können. Eine ähnlich starke Inhibition der Bakterienadhärenz wurde auch durch Zugabe des Sekretolytikums N-Acetylcystein erzielt. Die VWF-vermittelte Bakterienadhärenz wird durch das Sekretolytikum signifikant von $33,08 \pm 3,8$ Pneumokokken/Zelle auf $25,7 \pm 2,4$ Bakterien pro Zelle reduziert (Abbildung 4 20, grauer Balken). Es ist anzumerken, dass die Zugabe von N-Acetylcystein auch ohne VWF-Präinkubation zu einer deutlichen, nicht-signifikanten Erhöhung der Bakteriengrundadhärenz auf $24,8 \pm 2,8$ Pneumokokken/Zelle führt, so dass hier ergänzende Bindungseffekte eine Rolle spielen könnten, die in der Ergebnisbewertung berücksichtigt werden müssen (Abbildung 4-21 A, verglichen mit Abbildung 4-22 I und J). Der VWF enthält in seiner C-terminalen C2-Domäne eine Sequenz mit den Aminosäuren Arginin, Glutamin und Asparagin (RGD), die als konservierte und ubiquitär vorkommende Bindungsstelle für Integrinrezeptoren charakterisiert wurde (Springer, 2014). Da HUVECs verschiedene Integrine auf ihrer Oberfläche exprimieren (Bergmann *et al.*, 2009, Lüttge M., Dissertation 2011), sollte durch Verwendung von synthetisch-produzierten RGD-Peptiden untersucht werden, ob diese Bindungsstellen in der VWF-vermittelten Adhärenz eine Rolle spielen. Zur Kontrolle der

Spezifität wurde das modifizierte RGE-Peptid ebenfalls in den Inhibitionsstudien eingesetzt. In Anwesenheit eines der beiden Peptide wurde eine geringe Abnahme der VWF-vermittelten Adhärenz festgestellt (Abbildung 4 20, grauer Balken), die jedoch nicht signifikant war. Ohne VWF-Präinkubation war die Anzahl adhärenter Bakterien in Anwesenheit von RGD- oder RGE Peptid mit $30,6 \pm 3,8$ Bakterien pro Zelle (RGD) bzw. $29,3 \pm 3,5$ Bakterien pro Zelle (RGE) deutlich höher als im Vergleich zur Kontrolle ($19,01 \pm 3,6$ Pneumokokken/Zelle). Es scheinen unspezifische Hintergrundbindungen stattzufinden, die eine abschließende Bewertung dieses Inhibitionsansatzes sehr erschweren (Abbildung 4 20, schwarze Balken). In der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt sich die erhöhte Adhärenz der Bakterien auch ohne VWF-Präinkubation (Abbildung 4-22 K bis N).

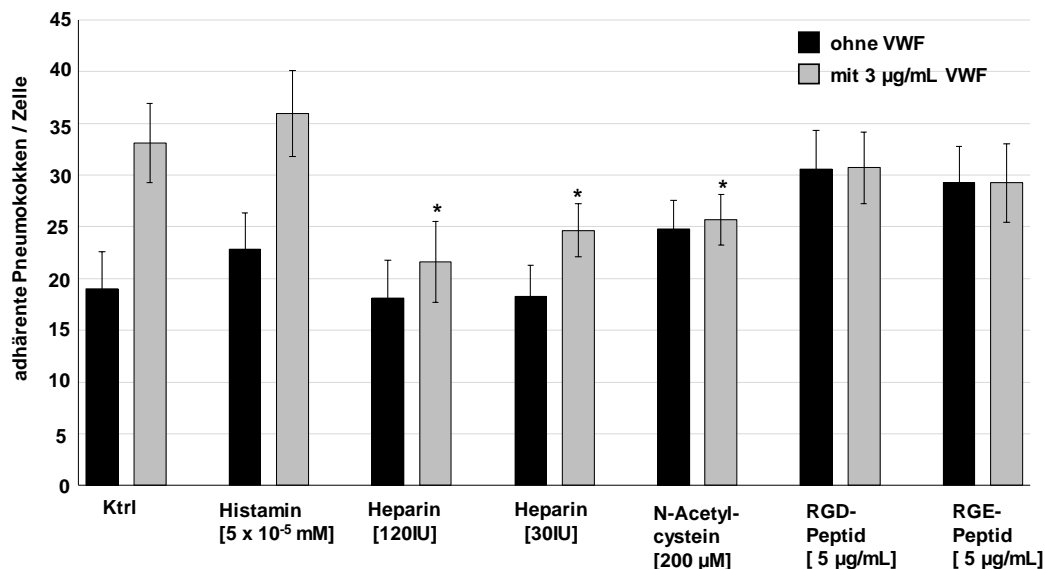


Abbildung 4-20: Quantitative Bestimmung der Anzahl adhärenter Pneumokokken der Infektionsanalysen mit Endothelzellen

In den Infektionsanalysen wurden die Komponenten Histamin [5 x 10⁻⁵ mM], Heparin [120 IU], Heparin [30 IU], N-Acetylcystein [200 µM], RGD-Peptid [5 µg/mL] und RGE-Peptid [5 µg/mL] getestet. Dargestellt ist die Anzahl adhärenter Pneumokokken pro HUVEC Zelle. Die Komponenten wurden jeweils ohne und mit 3 µg VWF zu den

HUVECs gegeben. Der P-Wert für das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0,03$ im Vergleich zu $3 \mu\text{g/mL}$ VWF (Ktrl, grauer Balken). Abbildung Aus der Bachelorarbeit von Karen Lahme, 2017.

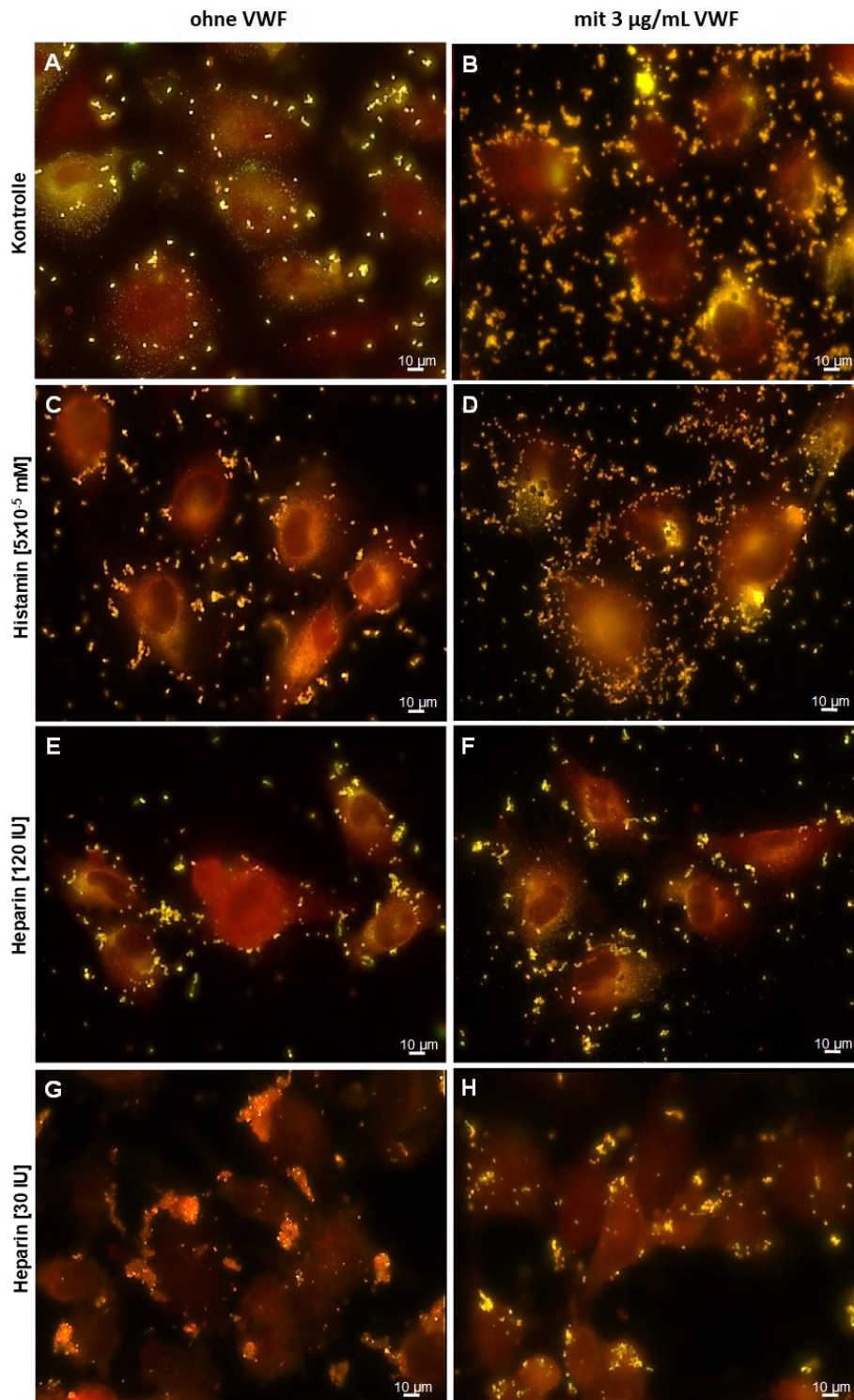


Abbildung 4-21: Fluoreszenzaufnahmen der Überlagerungsbilder von repräsentativen Bereichen der Infektionsanalysen mit Endothelzellen und Bindungsmodulatoren Bildtafel 1 von 2

Die adhärenenten Pneumokokken erscheinen durch die doppelte Antikörperdetektion in gelb. Die invasiven Bakterien fluoreszieren in rot. Die Aufnahmen (A, B) zeigen die Kontrolle mit und ohne VWF-Vorinkubation der

Pneumokokken. (C, D) stellen die Infektion mit Histamin Vorinkubation dar. Die Aufnahmen (E) und (F) zeigen die Vorinkubation mit Heparin 120 IU und (G, H) mit Heparin 30 IU. Die Aufnahmen wurden mit dem Laser Scanning Mikroskop Leica DMI8, mit dem 63x Ölimmersionsobjektiv erstellt. Die Aufnahmen wurden mit der LasX Software bearbeitet. Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. Die Bilder der Einzelkanäle der Anregungswellenlängen 488 nm und 568 nm sind dem Anhang zu entnehmen. Abbildung Aus der Bachelorarbeit von Karen Lahme, 2017.

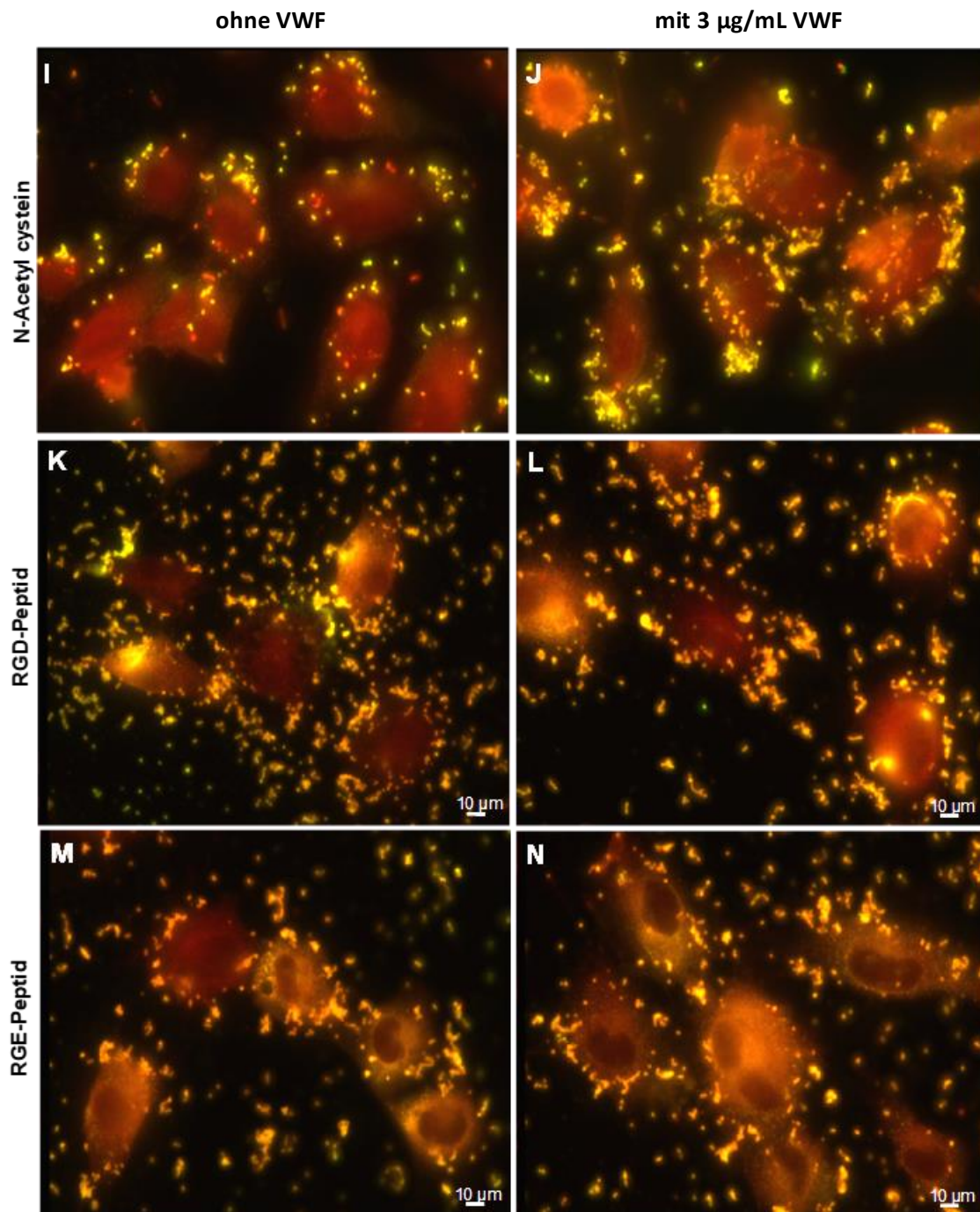


Abbildung 4-22: Fluoreszenzaufnahmen der Überlagerungsbilder von repräsentativen Bereichen der Infektionsanalysen mit Endothelzellen und Bindungsmodulatoren Bildtafel 2 von 2. Die adhärenen Pneumokokken erscheinen durch die doppelte Antikörperdetektion gelb. Die invasiven Bakterien fluoreszieren rot. Die Bilder (I, J) stellen den Infektionsversuch mit N-Acetylcystein dar. (K, L) und (M, N) zeigen die Infektion mit dem RGD- bzw. RGE-Peptid. Die Aufnahmen wurden mit dem Laser Scanning Mikroskop Leica DMI8, mit dem 63x Ölimmersionsobjektiv erstellt. Die Aufnahmen wurden mit der LasX Software bearbeitet.

Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Die Bilder der Einzelkanäle der Anregungswellenlängen 488 nm und 568 nm sind dem Anhang zu entnehmen.

Ergänzend zu den Inhibitionsanalysen im Zellkulturinfektionsmodell, in denen die Endothelzellen mit VWF und verschiedenen Bindungsmodulatoren präinkubiert worden waren, erfolgten Infektionsstudien nach identischem Protokoll aber nach Präinkubation der Bakterien. Dieses Versuchsdesign sollte Aufschluss darüber geben, wie die Bindungsmodulatoren die VWF-Interaktion auf der Bakterienoberfläche beeinflussen. Neben Heparin und N-Acetylcystein wurden hierbei auch Peptide verwendet, die verschiedene Bindungsstellen im Eno-Molekül der Pneumokokken repräsentierten. Bei dem Plasminogenbindungspeptid handelt es sich um eine in vorherigen Studien aus der eigenen AG publizierte Aminosäuresequenz (FYDKERKVYDT) der Eno, die die Bindung an Plasminogen vermittelt (Bergmann *et al.*, 2005; 2007). Zudem wurden in diesen Infektionsanalysen zwei weitere Peptide eingesetzt, die unterschiedlich lange Aminosäuresequenzen des in dieser Arbeit lokalisierten putativen VWF-Bindungsmotifs der Eno repräsentieren („short“- und „long“-Peptid). Die Quantifizierung der Bakterienadhärenz ergab, dass ohne VWF eine Anzahl von $27,6 \pm 3,0$ Pneumokokken/Zelle ermittelt wurde, die nach Präinkubation der Bakterien mit 3 µg/mL VWF auf. Die Inkubation der Bakterien mit einem Wert von $43,8 \pm 3,7$ Pneumokokken pro Zelle auf nahezu das Doppelte signifikant anstieg (Abbildung 4-23). Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verdeutlichen die Zunahme der Anzahl gelb fluoreszierender Bakterien (Abbildung 4-24 A+B). Dieses Ergebnis bestätigt, dass sowohl die Präinkubation von humanen Zellen, als auch die der Bakterien mit VWF zu einer signifikanten Erhöhung der Pneumokokken Adhärenz an humanes Endothel führt. In Übereinstimmung mit der oben beschriebenen Beobachtungen für die RGD- und RGE-Peptide führte die Präinkubation der Bakterien mit den Eno-repräsentierenden Peptiden, dem Plasminogenbindungsmotif, dem „short“ Peptid und dem „long“ Peptid, zu einer deutlichen Erhöhung der bakteriellen Grundadhärenz bereits ohne Zugabe von VWF (Abbildung 4-23, schwarze Balken).

Diese Erhöhung ist auch in den repräsentativen Fluoreszenzaufnahmen zu erkennen (Abbildung 4-24 C für das Plasminogenbindungsmotif und Abbildung 4-25 K für das „short“ Peptid und M für das „long“ Peptid. Im Vergleich dazu wurde die VWF-vermittelte Adhärenz durch keines der drei Peptide verringert, sondern führte in Anwesenheit von VWF sogar zu einer marginalen Erhöhung der Anzahl adhärenter Pneumokokken auf $43,8 \pm 3,7$ Bakterien pro Zelle mit dem „short“-Peptid und $41,4 \pm 3,4$ mit dem „long“-Peptid (Abbildung 4-23, graue Balken). Die

Präinkubation der Bakterien mit den Modulatoren Heparin und N-Acetylcystein führt auch ohne VWF-Zugabe ebenso zu einer Erhöhung der bakteriellen Grundadhärenz von $27,6 \pm 3,0$ Pneumokokken pro Zelle auf $32,1 \pm 3,0$ Bakterien pro Zelle für N-Acetylcystein, auf $34,4 \pm 2,5$ Bakterien pro Zelle für 30 IU Heparin und $34,0 \pm 2,8$ Bakterien pro Zelle für 120 IU Heparin (Abbildung 4-23, graue Balken). Im Gegensatz zu den Peptiden, führte die Zugabe von Heparin selbst in der geringen Konzentration von 30 IU zu einer signifikanten Inhibition der VWF-vermittelten Pneumokokken-Adhärenz (Abbildung 4-23, schwarzer Balken). Die in Abbildung 4-24 E bis H im Vergleich zu Präinkubation mit VWF (Abbildung 4-24 B) dargestellten Mikroskopieaufnahmen bestätigen auch augenscheinlich die durch Auszählung quantifizierte Reduktion der Bakterienadhärenz nach Zugabe von Heparin. Die VWF-vermittelte Adhärenz verringerte sich nach Zugabe von 30 IU Heparin von $43,8 \pm 3,7$ Bakterien pro Zelle ohne Heparin auf signifikant auf $33,9 \pm 2,5$ Pneumokokken pro HUVEC nach Zugabe von 30 IU Heparin und ebenfalls signifikant auf $34,0 \pm 2,8$ Bakterien pro HUVEC bei 120 IU Heparin (Abbildung 4-23, graue Balken). Im Gegensatz dazu bewirkte die Zugabe von N-Acetylcystein keine signifikante Reduktion der VWF-vermittelten Adhärenz der Pneumokokken an Endothelzellen (Abbildung 4-23, grauer Balken).

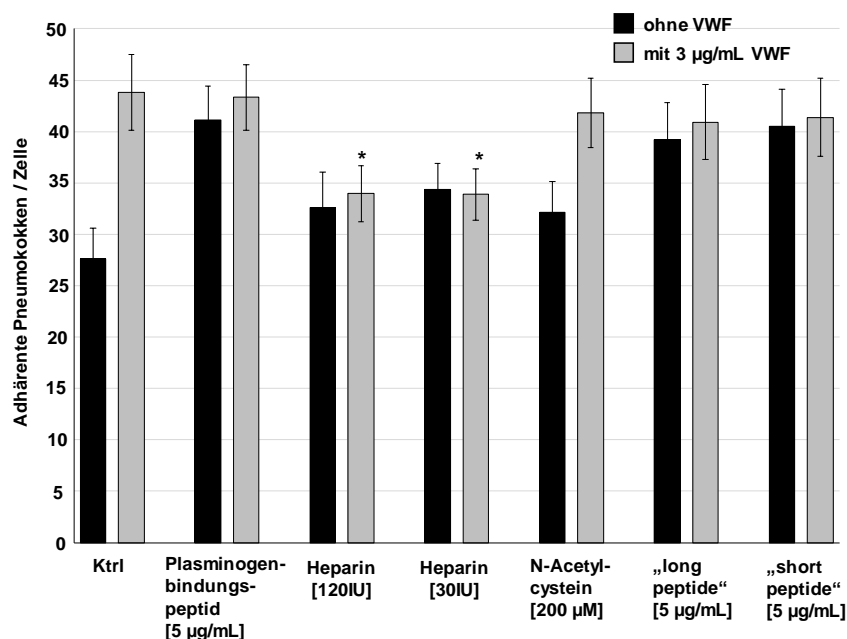


Abbildung 4-23: **Quantitative Bestimmung der Anzahl adhärenter und invasiver Pneumokokken der Infektionsanalysen mit Endothelzellen**

In den Infektionsanalysen wurden die Komponenten Plasminogenbindungsmotif [5 µg/mL], Heparin [120 IU], Heparin [30 IU], N-Acetylcystein [200 µM], „long peptide“ [5 µg/mL] und „short peptide“ [5 µg/mL] getestet. In dem Diagramm ist die Anzahl adhärenter Pneumokokken pro HUVEC Zelle dargestellt. Die Komponenten wurden

jeweils ohne und mit 3 µg VWF zu den HUVECs gegeben. Der P-Wert für das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0,005$ im Vergleich zu 3 µg/mL VWF. Abbildung Aus der Bachelorarbeit von Karen Lahme, 2017.

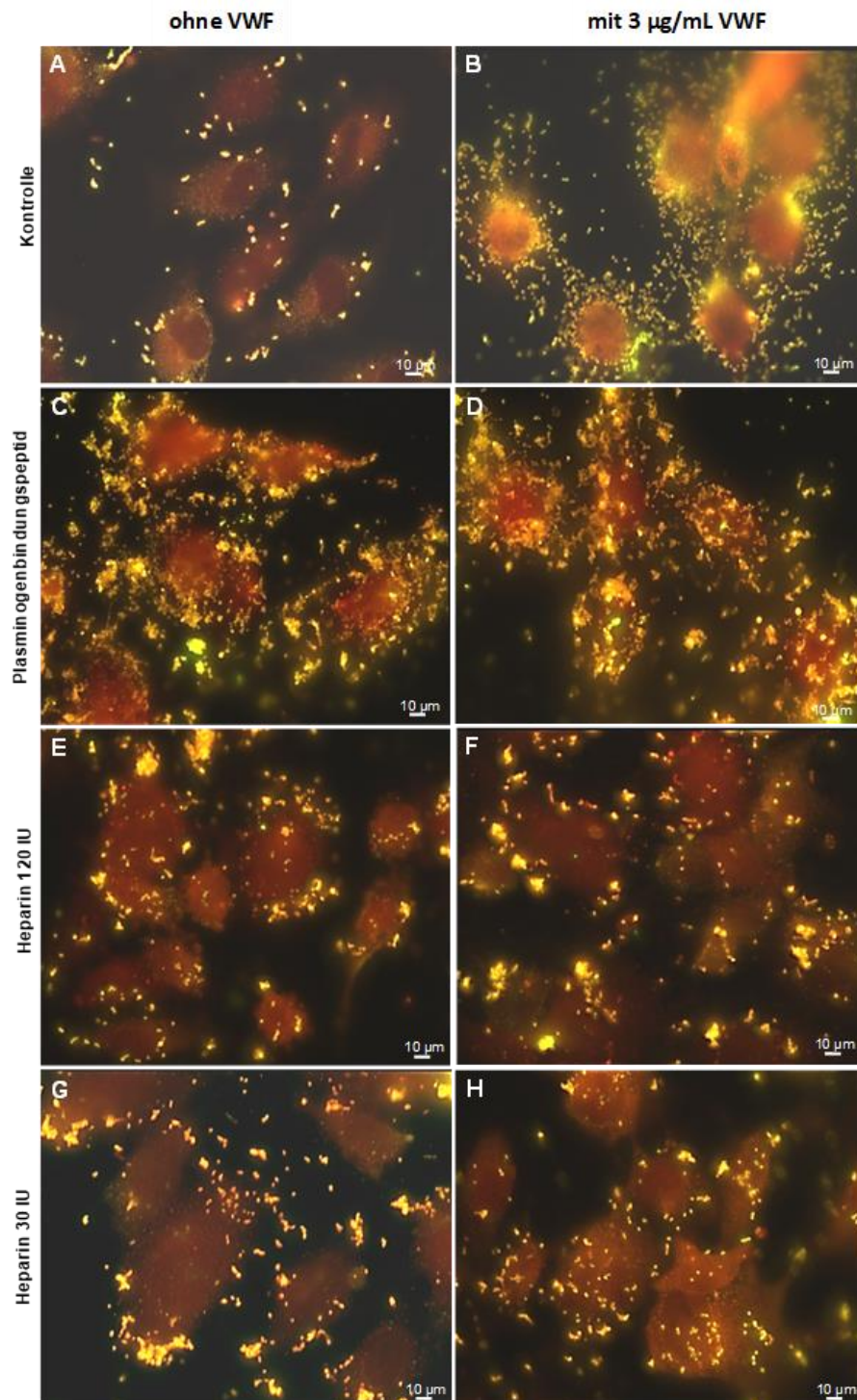


Abbildung 4-24: Fluoreszenzaufnahmen der Überlagerungsbilder von repräsentativen Bereichen der Infektionsanalysen mit Pneumokokken-Vorinkubation Teil 1. Die adhärenente Pneumokokken erscheinen durch die doppelte Antikörperdetektion gelb. Die invasiven Bakterien fluoreszieren rot. Die Aufnahmen (A, B) zeigen die Kontrolle ohne und mit VWF Vorinkubation der Pneumokokken. (C, D) stellen die Infektion mit der Plasminogenbindungspeptid Vorinkubation dar. Die Aufnahmen (E, F) zeigen die Vorinkubation mit Heparin 120

IU und (G, H) mit Heparin 30 IU. Die Aufnahmen wurden mit dem Laser Scanning Mikroskop Leica DMI8, mit dem 63x Ölimmersionsobjektiv erstellt. Maßstabsbalken entspricht 10 μm . Die Bilder der einzelnen Fluoreszenzkanäle mit den Anregungswellenlängen 488 nm und 568 nm sind dem Anhang zu entnehmen. Die Aufnahmen wurden mit der LasX Software bearbeitet. Abbildung Aus der Bachelorarbeit von Karen Lahme, 2017.

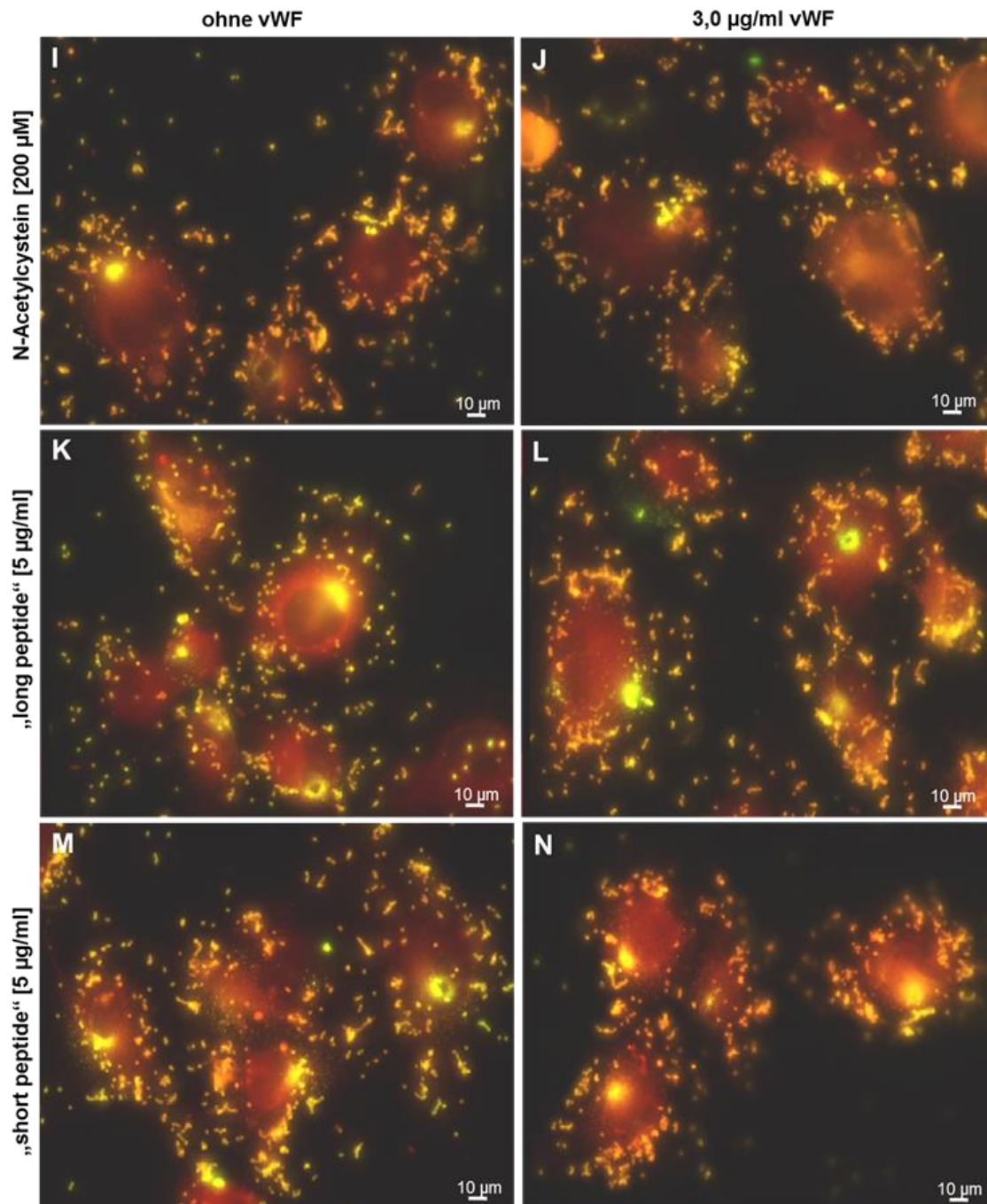


Abbildung 4-25: Fluoreszenzaufnahmen der Überlagerungsbilder von repräsentativen Bereichen der Infektionsanalysen mit Pneumokokken-Vorinkubation Teil 2

Die adhärennten Pneumokokken erscheinen durch die doppelte Antikörperdetektion gelb. Die invasiven Bakterien fluoreszieren rot. Die Bilder (I, J) stellen den Infektionsversuch mit N-Acetyl cystein dar. (K, L) und (M, N) zeigen die Infektion mit dem „long peptide“ bzw. „short peptide“. Die Aufnahmen wurden mit dem Laser Scanning Mikroskop Leica DMI8, mit dem 63x Ölimmersionsobjektiv erstellt. Maßstabsbalken entspricht 10 μm . Die Bilder

der einzelnen Fluoreszenzkanäle mit den Anregungswellenlängen 488 nm und 568 nm sind dem Anhang zu entnehmen. Die Aufnahmen wurden mit der LasX Software bearbeitet. Abbildung Aus der Bachelorarbeit von Karen Lahme, 2017.

Insgesamt bestätigen die Infektionsanalysen die Funktion des VWF als Adhäsionskofaktor für die Pneumokokken-Endothel-Interaktion. Während eine Peptid-Zugabe keine inhibitorische Wirkung auf die VWF-vermittelte Adhärenz vermittelt, führt die Anwesenheit von Heparin auch in geringeren Konzentrationen zu signifikanten Reduktionen der VWF-vermittelten Adhärenz.

4.4. Elektronenmikroskopische Visualisierung der Pneumokokken-VWF-Interaktion

In Ergänzung zu den fluoreszenzmikroskopisch-analysierten Infektionsstudien wurden einige der mit Pneumokokken-infizierten HUVEC-Proben mit und ohne Zugabe von 1 mM Histamin für eine elektronenmikroskopische Visualisierung gesondert fixiert. Die rasterelektronenmikroskopische Analyse erfolgte in Kooperation mit Prof. M. Rohde vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig. Das Ergebnis der Mikroskopie zeigt die Ausbildung von fadenförmigen Proteinstrukturen auf der Oberfläche der Endothelzellen, an denen Pneumokokken des Serotyps 35A adhären (Abbildung 4-26 A). Die Proteinfäden werden aus deutlich-erkennbaren Poren aus der Zelloberfläche sekretiert (weißer Pfeil, Abbildung 4-26 B). Diese Poren ähneln den von Mourik und Mitarbeitern beschriebenen „secretory pods“, die als Sekretionsöffnung der WPB fungieren (Mourik et al., 2013). Auch in diesem Beispiel sind Pneumokokken zu erkennen, die an einen Proteinfaden haften, bei dem es sich um VWF handeln könnte. Der Durchmesser und die Länge der Proteinfäden variieren zwischen 100 nm und 4 µm (Abbildung 4-26 C+E). Abbildung 4-26 E zeigt eine Ausschnittsvergrößerung der Abbildung in D (weißes rechteck), in der ebenfalls Pneumokokken an einem Proteinfaden haften. Zur endgültigen Identifizierung des Fadens als multimerisiertes VWF-Molekül sind in weiteren elektronenmikroskopischen Studien Antikörper-basierte Detektionsanalysen geplant.

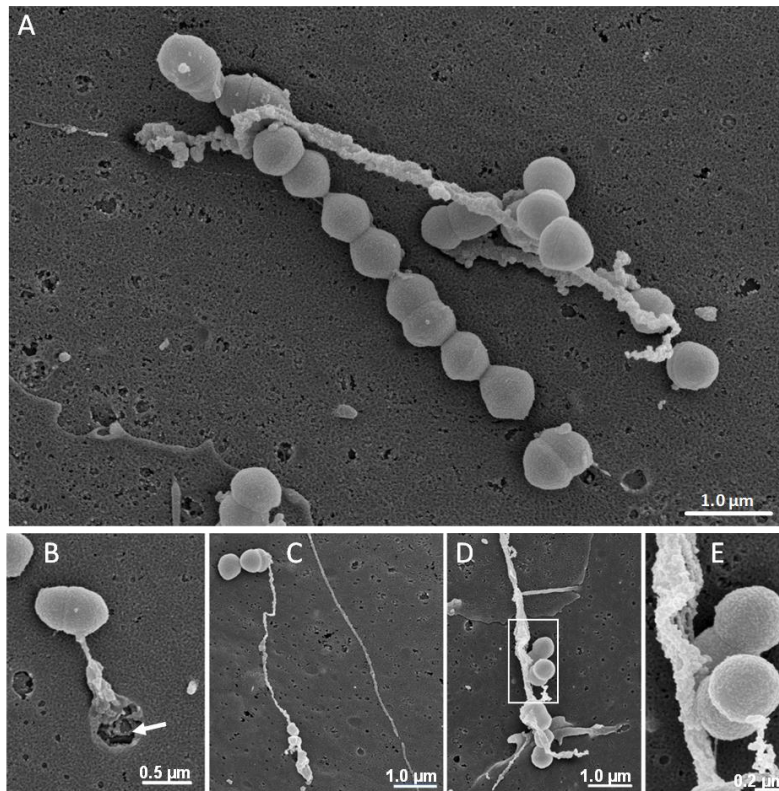


Abbildung 4-26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pneumokokken an faden-artigen Proteinen auf der Oberfläche von HUVECs

In (A) ist eine Pneumokokken-Kette auf der Oberfläche einer HUVEC-Zelle dargestellt, wie sie an ein von der Zelle sekretiertes fadenförmiges Protein binden. In (B) ist im Detail, mit einem weißen Pfeil, die Sekretion aus einer Pore gezeigt und die Bindung des fadenförmigen Proteins an eine Diplokokke. (C) zeigt einen über 4 µm langen Faden im rechten Bildbereich und links daneben die Bindung von Pneumokokken an einen verhältnismäßig dünnen fadenförmigen Protein. In (D) ist die Bindung von Pneumokokken an einen Faden mit einem verhältnismäßig großen Durchmesser von ca. 100 nm gezeigt, welche in (E) in einer Ausschnittsvergrößerung verdeutlicht wird. Die Aufnahmen wurden von einem statischen Infektionsversuch erstellt, bei dem die VWF-Sekretion mit 1mM Histamin stimuliert wurde. Der Maßstabsbalken ist in (A), (C), und (D) 1 µm, in (B) 0,5 und in (E) 0,2 µm groß. Die Aufnahmen wurden von Prof. Manfred Rohde erstellt in einer Kooperation mit dem HZI Braunschweig.

Die elektronenmikroskopische Analyse wurde ebenfalls eingesetzt, um visualisieren zu können, in welcher Konformation der in den Bindungs- und Infektionsstudien eingesetzte kommerziell erworbene und aus humanem Plasma aufgereinigte VWF (Merck) vorliegt. Zu diesem Zweck wurden Aliquots der von Merck bezogenen VWF Proteinchargen in Kooperation mit M. Rohde am HZI in Braunschweig einer transmissionselektronenmikroskopischen Analyse unterzogen. Die Ergebnisse der Visualisierung sind in Abbildung 4-27 dargestellt. In den aus humanem Plasma isolierten Proteinchargen liegt das VWF Molekül vorwiegend in globulärer, aber teilweise auch in fädiger Form vor (Abbildung 4-27, weißer Pfeile). Diese Fäden sind jedoch sehr viel kürzer als die unter Scherstress-Einwirkung gebildeten VWF-Fäden und liegen daher nicht in absolut elongierter Form vor.

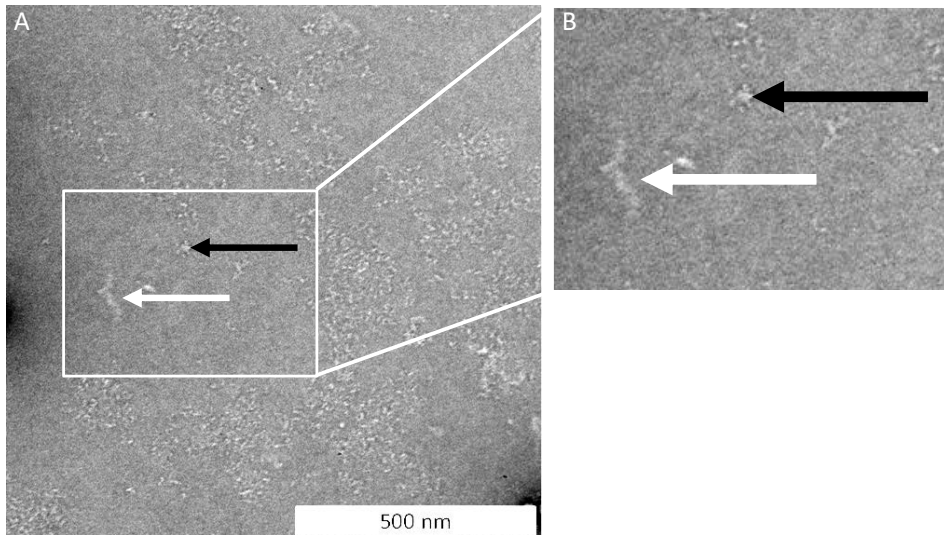


Abbildung 4-27: Elektronenmikroskopische Analyse des eingesetzten VWF von Merck

In (A) ist eine für die elektronenmikroskopische Analyse immobilisierte Probe des eingesetzten VWF von Merck dargestellt. In der Ausschnittsvergrößerung von (A) ist in (B) sowohl globulärer VWF (schwarzer Pfeil) mit einem Durchmesser von ca. 15 nm und fadenförmiger VWF (weißer Pfeil) mit einer Länge von ca. 100 nm zu erkennen. Der Maßstabsbalken ist 500 nm. Die Aufnahmen wurden von Prof. Manfred Rohe erstellt in einer Kooperation mit dem HZI Braunschweig.

Damit konnte gezeigt werden, dass in dem für die vorliegende Arbeit eingesetzte humane VWF (Merck) VWF sowohl in globulärer, als auch in filamentöser Konformation auftritt und somit in beiden Konformationen für eine Bindung durch die Pneumokokken auch in statischen Versuchen zu Verfügung steht, wenngleich die VWF-Filamente bei Scherstress häufiger und in größerer Länge auftreten.

4.5. Erstellung von RFP-exprimierenden Pneumokokken-Stämmen zur mikroskopischen Visualisierung in Echtzeit

Zur Visualisierung der adhärennten und internalisierten Bakterien im statischen Zellkulturinfektionsmodell hatte sich eine differenzielle Immunfluoreszenz-Färbung (DIF) zur Detektion der Pneumokokken bewährt. Für die geplanten Echtzeitvisualisierungen im Flusskultivierungssystem und im *in vivo* Infektionsmodell des Zebrafisches war es jedoch erforderlich, RFP-exprimierende Bakterien einzusetzen, um während der Infektion und Interaktion in den komplexen Systemen für die notwendige Schärfenfokussierung eine spezifische und schnelle Detektion zu ermöglichen. Zur Integration des *rfp*-Gens in das Genom der Pneumokokken wurde ein aus der Arbeitsgruppe um Prof. Veening an der Universität in Lausanne generiertes Konstrukt verwendet. Es handelt sich um ein Gen für ein Histone-like protein A (*hlpA*), das mit einem Gen für ein RFP fusioniert war

und zur Resistenzselektion ein Chloramphenicol-Acetyltransferase Gen enthält (Kjos und Venning, 2014). Die Herstellung der RFP-exprimierenden Pneumokokken-Stämme erfolgte im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Ina-Kristin-Behrens und Valentina Elspass nach den in Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 beschriebenen Methoden.

Die Pneumokokken-Stämme SP19 (Serotyp 35A), PM01 und PM09 wurden zur Transformation verwendet. Es handelt sich hierbei um den einen Pneumolysin-defizienten Serotyp 35A-Stamm (PM01) und einen Kapseldefizienten Serotyp 2-Stamm (PM09). Abbildung 4-28 zeigt das Ergebnis der DNA-Amplifikation des *rfp*-Konstruktes aus dem Genom der transformierten Stämme, die mit spezifischen Primern zur Selektion der Konstrukt-tragenden Transformanten durchgeführt worden ist. Die auf dem Agarosegel visualisierten Banden weisen eine Größe von ca. 3,8 kb auf und dies entspricht der theoretisch ermittelten Anzahl von 3.720 Basenpaaren. Die erfolgreiche Integration des Konstrukts wurde zudem durch das Wachstum der Bakterien auf Chloramphenicol-haltigem Festmedium bestätigt, sowie in der Fluoreszenzmikroskopie der Bakterien visualisiert (Abbildung 4-28 B, PM01 und C, PM09). Die erfolgreiche Generierung der RFP-exprimierenden Stämme ermöglichte die Verwendung in den im Folgenden beschriebenen systemischen Analysen zur Pneumokokken-VWF-Interaktion.

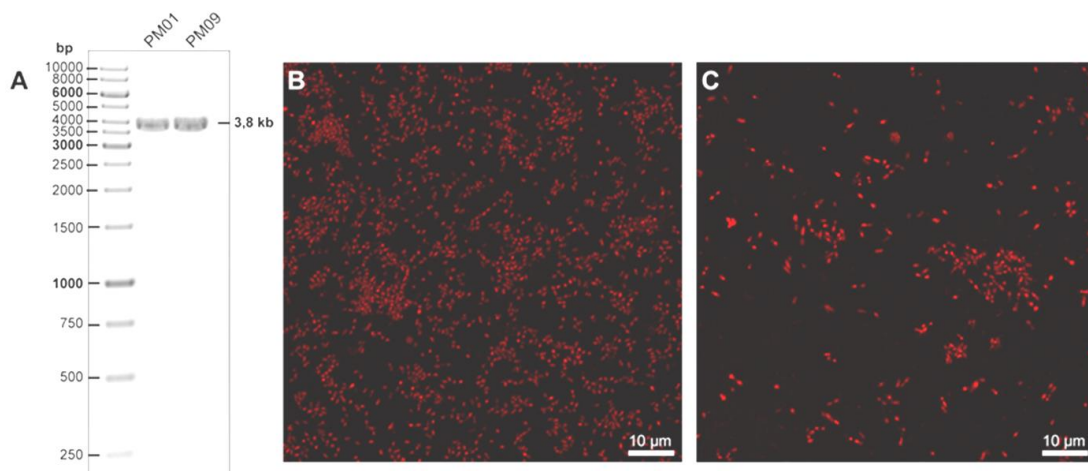


Abbildung 4-28: Verifikation der RFP-Transformation der Pneumokokken-Stämme PM01 und PM09

In (A) ist das Gelelektrophoresebild der PCR nach der Transformation der Mutanten PM01 und PM09 dargestellt. Mittels *hlpA*-Primern wurde das (*hlpA-rfp*)-*cam*-Konstrukt aus genomischer DNA der Transformanten amplifiziert. Banden bei 3,72 kb bestätigen die Insertion des Konstrukts in das Genom beider Stämme. Fluoreszenzaufnahmen der RFP-produzierenden PM01 Transformante (B) und der PM09 Transformante (C). Rot fluoreszierende Pneumokokken sind in beiden Aufnahmen zu erkennen. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem 63x Ölimmersionsobjektiv des Laser Scanning Mikroskop Leica DMI8 erstellt.

4.6. Visualisierung der Pneumokokken-Adhärenz an HUVEC in einer Flusskultivierungs-Infektion

Nachdem die unter statischen Bedingungen durchgeführten Zellkulturanalysen bestätigten, dass globulärer VWF die Pneumokokken-Adhärenz an HUVEC vermittelt, sollte nach Etablierung eines Mikrofluidiksystem der Firma ibidi®, eine Analyse der Interaktion zwischen Pneumokokken und elongiertem, multimerem VWF durchgeführt werden. Nur in der fädigen Konformation liegen die funktionell wichtigen VWF-Domänen in exponierter Weise vor und vermitteln die Funktion des VWF in der Thrombozytenrekrutierung und der endothelialen Verankerung. Um die Scherstressbedingungen im physiologischen Blutstrom simulieren zu können, wurden HUVEC wie in Kapitel 3.5.8 beschrieben unter im Flusssystem arteriellen Scherstress-Bedingungen bei einem von 10 dyn/cm² kultiviert. Die Etablierung dieses Flusssystem erfordert eine umfangreiche Testphase, in der verschiedene Pumpparameter, notwendige Abschirmungen gegen magnetische Störungen und auch geeignete Zellpopulation getestet und optimiert werden mussten. Die umfangreiche Etablierung erfolgte teilweise zusammen mit Ina-Kristin Behrens, die einen Teil der Masterarbeit bei der Firma ibidi® absolvierte und unter meiner Anleitung einen Teil der Flusskultivierungsetablierung durchführte. Die Kultivierung von Endothelzellen unter Scherstress-Einwirkung bewirkt eine Veränderung der Morphologie und der exprimierten Rezeptorprofile (Gogia und Neelamegham, 2015). Um den erfolgreichen Verlauf der Flusskultivierung bestätigen zu können, erfolgten daher unterschiedlich lange Kultivierungsanalysen bei 10 dyn/cm². Während in den ersten 24 h der Flusskultivierung die HUVEC eine „kopfsteinpflasterartige“-Morphologie aufwiesen, die auch in den statischen Analysen zu beobachten ist (Abbildung 4-29 B), waren die Zellen bereits nach 48 h und auch nach 71 h in einer sehr dicht-gepackten Zellschicht angeordnet und wiesen eine in Richtung des Flüssigkeitsstromes ausgerichtete längliche Zellmorphologie auf (Abbildung 4-29 C+D) Diese Anordnung und Zellkonformation entspricht dem differenzierten Endothel im physiologischen Blutgefäßsystem.

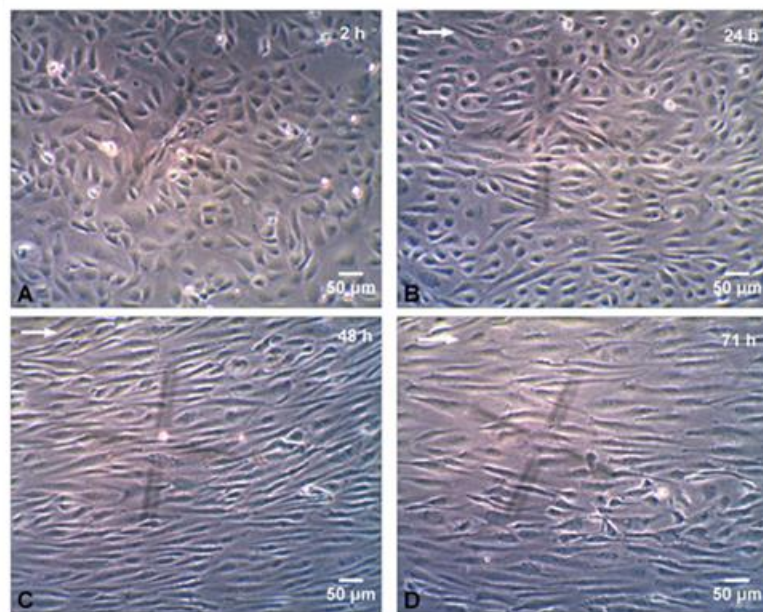


Abbildung 4-29: Kultivierung von HUVEC bei einem Scherstress von 10 dyn/cm² über einen Zeitraum von 71 Stunden

Die Bilder zeigen 2×10^6 Zellen/mL HUVEC nach Aussaat in einem Gelantine-beschichteten Slide nach zwei stündiger Kultivierung bei einem Scherstress von 10 dyn/cm² (A) und nach einer Flusskultivierung über 24 h (B), 48 h (C) und 71 h (D). Der weiße Pfeil zeigt die Flussrichtung an. Oben rechts im Bild ist die Dauer der Flusskultivierung und unten rechts im Bild ist der Maßstabsbalken mit 50 µm angegeben. Die Aufnahmen wurden mit einer Mikroskopkamera in 10-facher Vergrößerung nach Visualisierung in einem Axiovert 35 von Zeiss Mikroskop angefertigt. Abbildung aus der Masterarbeit von Ina-Kristin-Behrens, 2015.

Da bereits nach 48 h deutliche morphologische Zeichen einer ausgeprägten Endotheldifferenzierung beobachtet wurden, wurde diese Kultivierungsdauer für die weiteren Studien durchgeführt. Zur Visualisierung der VWF-Fäden wurde das Proben-Slide bei laufender Flusskultivierung in den Objektisch des Fluoreszenzmikroskops eingespannt und durch Zugabe von 1 mM Histamin die VWF-Ausschüttung stimuliert. Die Ausbildung von VWF-Fäden wurde durch einen FITC-konjugierten VWF-spezifischen Antikörper in Echtzeit mikrokopiert. Repräsentative Bildaufnahmen sind in Abbildung 4-30 dargestellt. Bereits nach 24 stündiger Flusskultivierung können nach Histamin-Stimulation netzartig verteilte, fädige VWF-Multimere auf der Oberfläche der HUVEC detektiert werden (Abbildung 4-30 A). Nach 72-stündiger Flusskultivierung sind auch deutlich längere VWF-Fäden auf den Zelloberflächen nachzuweisen, die Längen von über 130 µm erreichen. (Abbildung 4-30 B, roter Pfeil). Zudem konnten auf den HUVEC-Zellen neben den multimerisierten VWF-Fäden (Abbildung 2 C, roter Pfeil) auch stets globuläre VWF-Moleküle nachgewiesen werden (Abbildung 4-30 C, weißer Pfeil). Um sowohl kleinere netzartige, als auch längere VWF-Fäden auf differenzierten HUVEC in den Infektionsanalysen studieren zu können, erfolgte eine standardisierte

Flusskultivierung über einen Zeitraum von 48 h. Dementsprechend wurden alle Flusskultivierungs-Infektionen nach einer Kultivierung der HUVECs von 48 h unter Flussbedingungen durchgeführt. Bei den Versuchen im ibidi®-System kam sowohl globulärer (weißer Pfeil in Abbildung 4-30 C), als auch fadenförmig VWF (roter Pfeil in Abbildung 4-30 C) auf der Oberfläche der HUVECs vor.

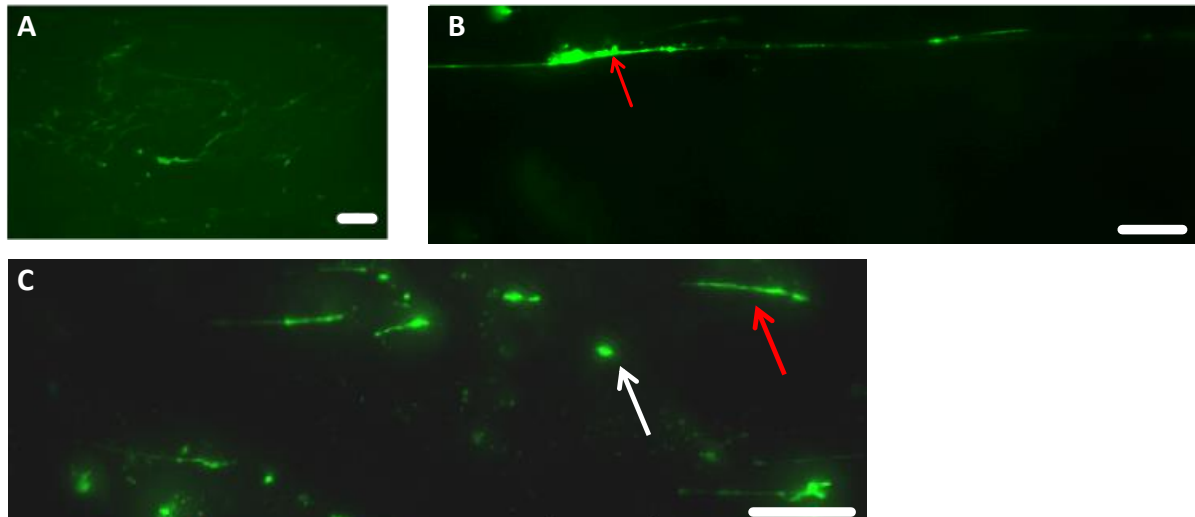


Abbildung 4-30: Unterschiedliche VWF-Konformationen und Strukturen in Abhängigkeit der Flusskultivierungszeit der HUVECs

In (A) ist eine netzwerkartige VWF-faden Struktur mit dünnen Fäden nach einer Flusskultivierungszeit der HUVECs von 24 h zu erkennen durch den eingesetzten FITC-konjugierten anti-VWF-Antikörper. In (B) nach einer Flusskultivierungszeit von 72 h sind keine netzwerkartigen Strukturen des VWF mehr zu erkennen und es kommen auch lange VWF-Fäden mit über 100 µm vor (roter Pfeil). In (C) sind sowohl globulärer (weißer Pfeil) als auch filamentöser VWF (roter Pfeil) mit Fadenlängen von 10 – 15 µm zu erkennen. Der Maßstabsbalken ist 10 µm groß. Im grünen Fluoreszenz-Kanal wird das Signal des FITC-konjugierten anti-VWF-Antikörpers detektiert. Alle Aufnahmen wurden mit einem 63-fachen Öl-Immersions-Objektiv mit einer Fluoreszenzbeleuchtung am Leica DMi8 aufgenommen und mit der Software LasX bearbeitet.

Zur Quantifizierung der Anzahl an VWF-Fäden, die sich innerhalb bestimmter Zeiträume auf den HUVEC-Zellen bilden, wurden in Abständen von jeweils 30 min Flusskultivierung auf repräsentativen Z-Stack-Fluoreszenzaufnahmen die Fadenanzahl in je mindestens 20 Sichtfelder visuell bestimmt. Dabei wurden von FITC-konjugierten Antikörper detektierte Strukturen über 3 µm Länge als VWF-Faden gezählt (Schneider *et al.*, 2007). Die Erhebung der Fadenanzahl erfolgte zudem nach Zugabe von RFP-exprimierenden Pneumokokken, die direkt zusammen mit dem Histamin zum Flussreservoir gegeben wurden und mit dem Flüssigkeitsstrom über die HUVEC-Zellen bei 10 dyn/cm² zirkulierten. Es handelt sich daher um eine Infektionsflusskultivierung. Die graphische Darstellung in Abbildung 4-31 verdeutlicht die nach 30 min, 60 min, 90 min, und 120 min bestimmte Anzahl der VWF-Fäden als hellgrüne Balken. Innerhalb der ersten Minuten bis zum Zeitpunkt 30 min konnten pro

mindestens 20 Gesichtsfeld min. $6,59 \pm 0,54$ VWF-Fäden nach Zugabe des 1 mM/mL Histamins detektiert werden (Abbildung 4-31). Das Maximum der ermittelten Fadenanzahl liegt bei $7,36 \pm 3,64$ Fäden/Bildausschnitt nach 60-minütiger Flusskultivierung (Abbildung 4-31, hellgrüner Balken). Danach nimmt die Menge an Fäden geringfügig auf einen Wert von $5,55 \pm 0,17$ zum Zeitpunkt bis 120 min ab. Zum Zeitpunkt 0 min, kurz bevor das Histamin hinzugegeben wurde, konnte eine Anzahl von globulären VWF von $2,7 \pm 2,7$ festgestellt werden. Dies spricht für eine nur minimal auftretende VWF-Sekretion, die mit dem Umbau des Mikrofluidik-Systems nach der Zugabe des FITC-konjugierten anti-VWF-Antikörpers detektiert werden konnte (Abbildung 4-31).

Die Anzahl der Pneumokokken, die an VWF-Fäden anheften, ist in Abbildung 4-31 in roten Balken als gesamte Anzahl pro Zeitwert und Sichtfeld angegeben. Nach 60-minütiger Flusskultivierung konnten nur wenige Bakterien vereinzelt an einigen Fäden detektiert werden, während mehr an der Endotheloberfläche anhafteten (brauner Balken, Abbildung 4-31). Im weiteren Verlauf der Infektion nimmt die Anzahl der an den Fäden anheftenden Pneumokokken von 1-2 Pneumokokken pro Sichtfeld nach 60 min auf maximal 6 Pneumokokken nach 120 min zu (Abbildung 4-31, roten Balken). Insgesamt liegt eine sehr niedrige Pneumokokken-Adhärenz vor, die mit der geringen Fadenzahl pro Sichtfeld korrigiert (Abbildung 4-31, hellgrüner Balken). Die Adhärenz ist jedoch in allen drei unabhängigen biologischen Replikaten stets festzustellen und bestätigt die Fähigkeit der Adhärenz von Pneumokokken an multimerisierte VWF-Fäden. Es sollte ferner überprüft werden, ob die Pneumokokken auch im Flusssystem in der Lage sind die VWF-Sekretion zu induzieren und an die sich bildenden VWF-Fäden binden zu können. Dies konnte bestätigt werden, wenn auch eine geringere VWF-Fadenanzahl zwischen 1 – 3 Fäden pro Gesichtsfeld verglichen mit 5 bis 7 bei Histamin Zugabe wesentlich geringer ist über den ganzen Versuchsverlauf (Diagramme im Anhang). Eine bakterielle Adhärenz an die VWF-Fäden ohne Histamininduktion konnte erst zwischen 60 und 90 min beobachtet werden und nicht schon zwischen 30 und 60 min, wie bei dem Ansatz mit Histamin. Diese spätere Adhärenz ist wahrscheinlich auch bedingt durch die geringere Anzahl an VWF-Fäden zu erklären (Diagramme im Anhang). Damit konnte aber gezeigt werden, dass die VWF-sekretion durch Pneumokokken sowohl unter statischen Bedingungen (Lüttge *et al.*, 2012) als auch unter physiologischen Scherstress-Bedingungen induziert werden kann. Repräsentative Aufnahmen dieser Interaktion sind im Anhang beigegefügt, genauso wie eine Zeitreihenaufnahme über 14 min, bei der die Induktion der VWF-Sekretion von Pneumokokken zu beobachten ist. Zusätzlich zu den ermittelten Werten wurde bei sämtlichen Ansätzen auch

die Anzahl an HUVECs/Bildausschnitt quantifiziert, um die Verhältnismäßigkeit der beobachteten Ergebnisse beurteilen zu können. Pro Bildausschnitt wurde jeweils 12-13 HUVECs gezählt. Diese Anzahl blieb während der Versuche relativ identisch.

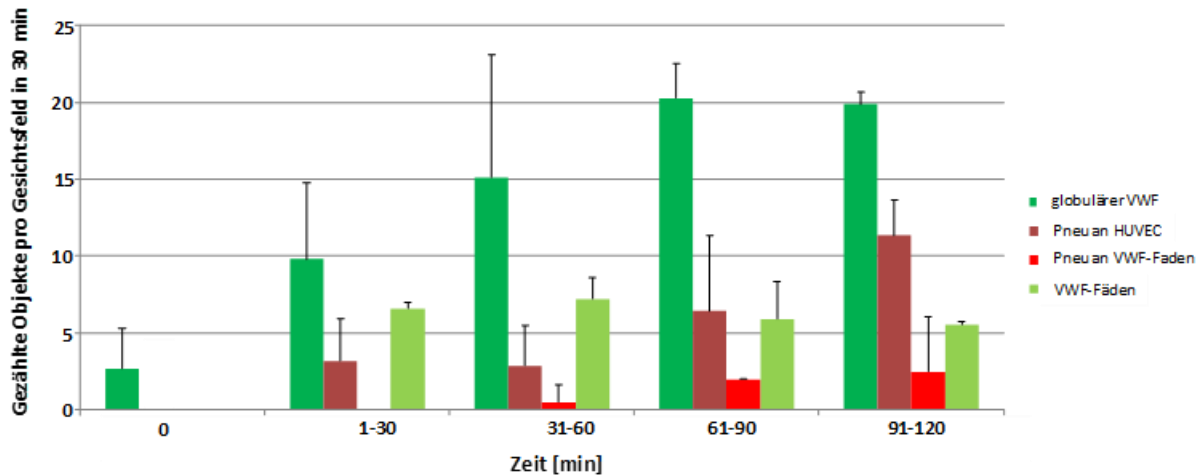


Abbildung 4-31: Darstellung ausgewählter Ereignisse bei dem Flusskulturinfektionsversuchen mit Histamin

Dargestellt sind jeweils zu den Zeitpunkten 0 min, 1-30 min, 31-60 min, 61-90 min und 91-120 min die gezählten Objekte pro Sichtfeld. Ausgewertet wurde die Anzahl an globulären und filamentösem VWF, sowie die Anzahl von Pneumokokken (Pneu) die an HUVECs und an VWF-Fäden gebunden haben. Ab einer Größe 3 μm wurden durch den FITC-konjugierten Antikörper detektierte Strukturen als VWF-Fäden gezählt. Die Daten setzten sich aus drei voneinander unabhängigen Versuchen und den Standardabweichungen der beobachteten Objekte zusammen. Die VWF-Sekretion wurde durch Zugabe von 1 mM/mL Histamin induziert am Versuchsbeginn. Der Zeitpunkt 0 min ist vor der Zugabe des Histamins. Es wurden alle 30 mindestens 20 Z-Stack angefertigt für die Auszählung und Pro Bildausschnitt über die Versuche eine Anzahl von 12-13 HUVECs/Bildausschnitt ausgezählt. Bei den Adhärenenten Pneumokokken an den VWF-Fäden (Pneu an VWF-Fäden) handelt es sich um die einzeln aufsummierten gesamten Ereignisse pro Zeiteinheit. Dabei wurde als ein Adhärenz-Ereignis erfasst, wenn eine oder mehrere Pneumokokken an einen VWF-Faden gebunden waren.

In Abbildung 4-32 1 ist ein repräsentatives Fluoreszenzmikroskopiebild zu sehen, das die Anheftung von mehreren RFP-exprimierenden Pneumokokken an einen ca. 170 μm langen VWF-Fäden erkennen lässt. Abbildung 4-32 2 zeigt einen weiteren repräsentativen Bildausschnitt aus der Infektionsflusskultivierung mit bis zu 5 einzelnen Diplokokken, die an einem ca. 15 μm langen VWF-Faden anhaften. Die VWF-Fäden wurden mit FITC-konjugiertem, VWF-spezifischen Antikörpern detektiert (Abbildung 4-32). Die rote Fluoreszenz der RFP-exprimierenden Pneumokokkenstammes PM40 ist in Abbildung 4-32 2B zu erkennen und wird auch in der FITC-Überlagerung in Abbildung 4-32 2C deutlich. Das Ergebnis des Fluoreszenzhistogramms im Bereich der weißen Rechteckmarkierung lässt erkennen, dass sich die Fluoreszenzintensitäten des grün-fluoreszierenden VWF und der rot-

fluoreszierenden Pneumokokken überlagern (Abbildung 4-32 2E). Diese Überlagerung spricht für eine Kolo-kalisation der Pneumokokken mit dem VWF und der Pneumokokken und bestätigt die auf der HUVEC-Oberfläche stattfindenden Adhärenz der Pneumokokken an VWF-Fäden. Es ist anzumerken, dass der Großteil der Fäden über die gesamte Zeitdauer der Versuchsbeobachtung stabil bestehen blieb, da keine Degradation durch ADAMTS13 oder Plasmin stattfindet. Anhand des in Abbildung 4-32 3A-C dargestellten repräsentativen Bildausschnitts konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Stabilität der VWF-Fäden nicht durch die Pneumokokken-Adhärenz beeinträchtigt wird. Die Fadenintegrität und die Bindung der Bakterien blieb über einen Zeitraum von 25 min stabil (Abbildung 5 3A-C). Im Anhang ist hierzu eine 14 min Zeitreihe von dem Bindungsereignis beigefügt. Diese Beobachtung lässt ebenso den Schluss zu, dass keine bakteriellen, VWF-degradierenden Faktoren von Pneumokokken exprimiert werden.

Um zu überprüfen, ob die Pneumokokken-Adhärenz an VWF-Fäden auch unter Flusskulturbedingungen durch Heparin inhibiert wird, wurden ergänzend zu den Infektionsanalysen unter statischen Kultivierungsbedingungen auch wie oben beschrieben eine Infektionsflusskultivierung nach Zugabe von 30 IU Heparin durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse ergab, dass nach Zugabe von Histamin auch in Anwesenheit von Heparin VWF-Fäden gebildet wurden. Die Auswertung der Mikroskopie Bilder ergab weiterhin, dass auch nach zwei-stündiger Zirkulation RFP-exprimierender Pneumokokken in Anwesenheit von Heparin keine Adhärenz an die VWF Fäden und auch nicht an die Endothelzelloberfläche detektiert werden konnte. Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen sind im Anhang beigefügt. Dieses Ergebnis zeigt, dass Heparin die Interaktion zwischen Pneumokokken und sowohl globulärem, als auch elongiertem, multimerisiertem VWF inhibiert und deutet daraufhin, dass die in der VWF-A1-Domäne befindlichen Heparinbindungsstelle eine wichtige Funktion in der grundsätzlichen Interaktion zwischen Pneumokokken und VWF spielt. Im Rahmen dieser Infektionsflusskultivierungen wurden auch hitzeinaktivierte Pneumokokken eingesetzt (PM40). Diese Bakterien wiesen trotz Hitzeinaktivierung noch eine RFP-Expression auf, zeigten jedoch keine Anheftung mehr an die VWF-Fäden oder an die Endotheloberflächen und kein Wachstum mehr nach dem Ausplattieren (repräsentative Aufnahmen im Anhang).

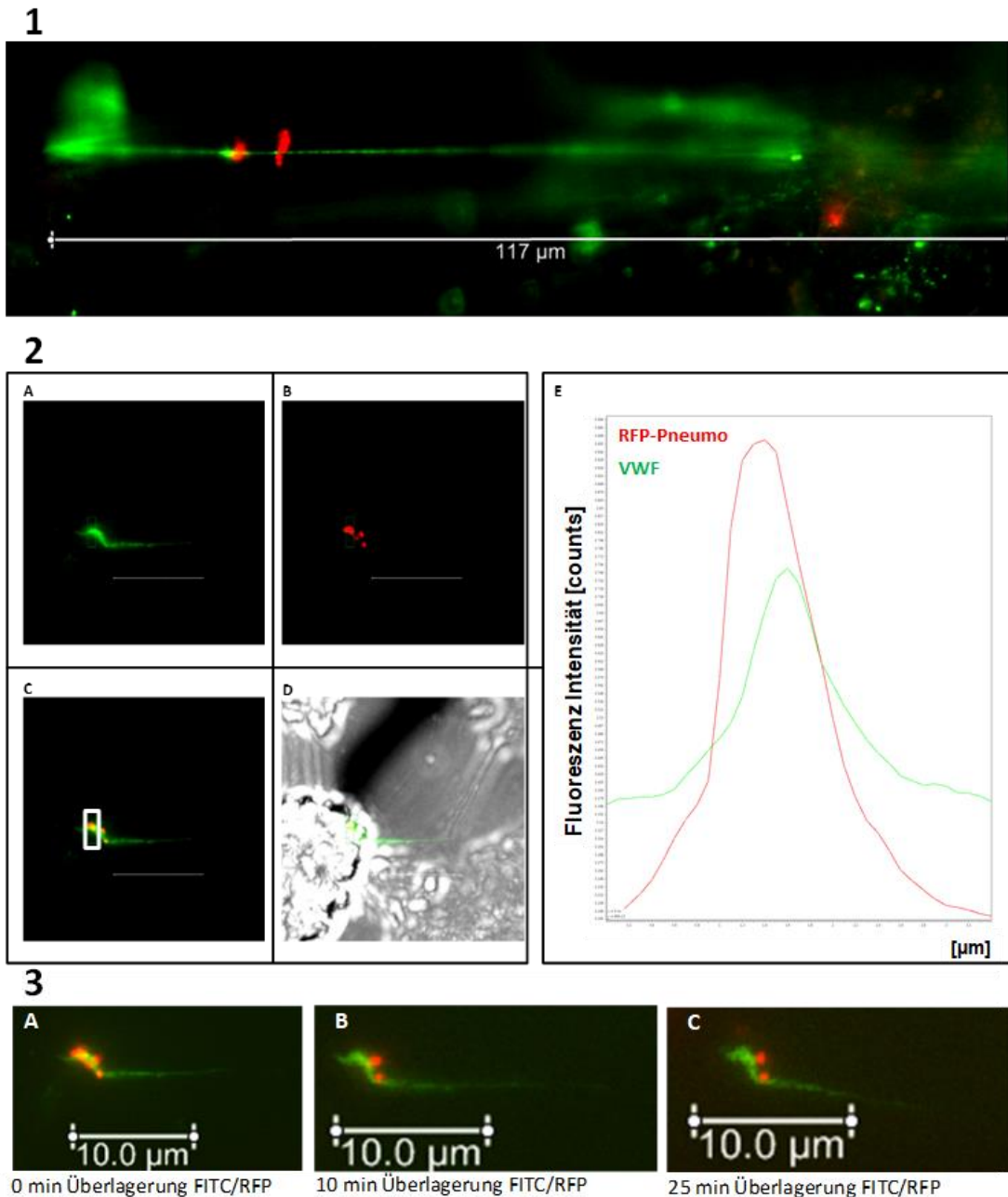


Abbildung 4-32: Bindung von Pneumokokken an VWF-Fäden unter konstantem Scherstress von 10 dyn/cm²

In (1) ist die Bindung einer Pneumokokkenkette an einen mehr als 117 µm langen Faden dargestellt. In diesem Versuch wurde 1 mM/mL Histamin zum Stimulieren der VWF-Sekretion eingesetzt. Es handelt sich um das Überlagerungsbild aus dem roten Fluoreszenz- und grünen Fluoreszenz-Kanal. In (2) ist die Bindung von Pneumokokken an einen VWF-Faden über einer HUVEC-Zelle dargestellt. Bei (A) handelt es sich um den grünen Fluoreszenz-, bei (B) um den roten Fluoreszenz-Kanal. Bei (1C) ist die Überlagerung des grünen Fluoreszenz- und roten Fluoreszenz-Kanals dargestellt und in (D) das Hinzufügen des Hellfeld-Bildes mit der HUVEC-Zelle unter dem VWF-Faden mit den gebundenen Pneumokokken. (D) stellt das Fluoreszenz-Histogramm an der mit dem weißen Kasten in (C) markierten Stelle dar. Es zeigt die Überlagerung des Signalhöhepunktes vom roten RFP- mit dem grünen FITC-Signal. Diese Überlagerung spricht für eine Kolo-kalisation der Pneumokokken mit dem VWF. In (3) ist die Zeitreihe einer stabilen Überlagerung von 0 min (A) über 10 min (B) zu 25 min (C) in einem konstanten Scherstress von 10 dyn/cm² dargestellt. Dies spricht für eine stabile Interaktion zwischen VWF und den Pneumokokken über einen Zeitraum von 25 min. Alle Aufnahmen wurden mit einem 63-fachen Öl-Immersions-Objektiv mit einer Fluoreszenzbeleuchtung am Leica DMi8 aufgenommen und mit der Software LasX bearbeitet. Die Maßstabsbalken bei den Teilabbildungen (2) und (3) sind 10 µm lang. Im grünen Fluoreszenz-Kanal wird das

Signal des FITC-konjugierten anti-VWF-Antikörpers detektiert, im roten Fluoreszenz-Kanal das RFP-Signal der PM40 Pneumokokken.

Aufgrund der Beobachtung, dass Pneumokokken auch in der Infektionsflusskultivierung vermehrt an die Endotheloberfläche binden, wurde überprüft, ob Pneumokokken während der Zirkulation im Fluss auch VWF-Proteine auf der Oberfläche rekrutieren. Die Fluoreszenzvisualisierung in den einzelnen Farbkanälen, sowie in der Überlagerung bestätigt, dass nach 90-minütiger Flusskultivierung VWF auf der bakteriellen Oberfläche nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4-33). Die Kolokalisation wurde durch die Darstellung eines Fluoreszenzhistogramms bestätigt. Die Überlagerung der Fluoreszenzspektren des VWF-Signals wird in grün und die des Bakteriensignals in rot angezeigt (Abbildung 4-33 E). In Kontrollstudien wurde getestet, ob der verwendete FITC-markierte VWF-spezifische Antikörper unspezifisch an die Bakterienoberfläche bindet (Abbildung 4-34). Die Kontrolldarstellung in Abbildung 4-34 D belegt, dass es keine unspezifische Hintergrundfluoreszenz des Antikörpers detektiert werden kann.

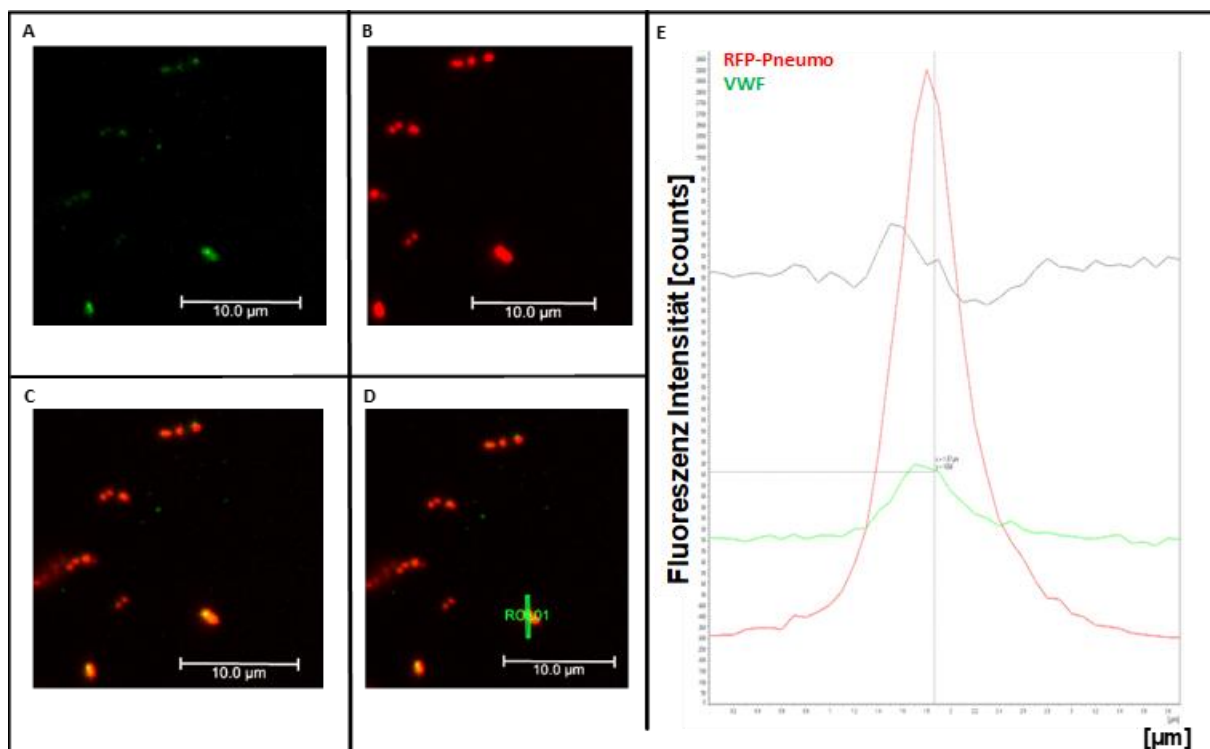


Abbildung 4-33: Rekrutierung von VWF an die Pneumokokken Oberfläche in der Flusskultivierung

Dargestellt sind in (A) und (B) der grünen Fluoreszenz- und roten Fluoreszenz-Kanal, in (C) und (D) die Überlagerung beider Kanäle, sowie in (D) die „region of interest“, die für die Erstellung des Fluoreszenz-Histogramms in E genutzt wurde mit einem hellgrünen Balken (ROI 01). Bei der Überlagerung des grünen Fluoreszenz- mit dem roten Fluoreszenz-Kanal ist eine Überlagerung beider Signale durch die gelbe Farbe in (C)

und (D) zu erkennen. € stellt das Fluoreszenz-Histogramm an der mit dem hellgrünen Balken in (D) markierten Stelle dar. Es zeigt die Überlagerung des Signalhöhepunktes vom roten RFP- mit dem grünen FITC-Signal. Diese Überlagerung spricht für eine Kolokalisation der Pneumokokken mit dem VWF. Für die Aufnahmen wurde der Fluss bei einem laufenden Flussinfektionsversuch nach 90 min gestoppt und die im Medium zirkulierenden Pneumokokken aufgenommen, nachdem diese zum Stillstand gekommen waren. Alle Aufnahmen wurden mit einem 63-fachen Öl-Immersion-Objektiv mit einer Fluoreszenzbeleuchtung am Leica DMi8 aufgenommen und mit der Software LasX bearbeitet. Die Maßstabsbalken sind 10 µm lang. Im grünen Fluoreszenz-Kanal wird das Signal des FITC-konjugierten anti-VWF-Antikörpers detektiert, im roten Fluoreszenz-Kanal das RFP-Signal der PM40 Pneumokokken.

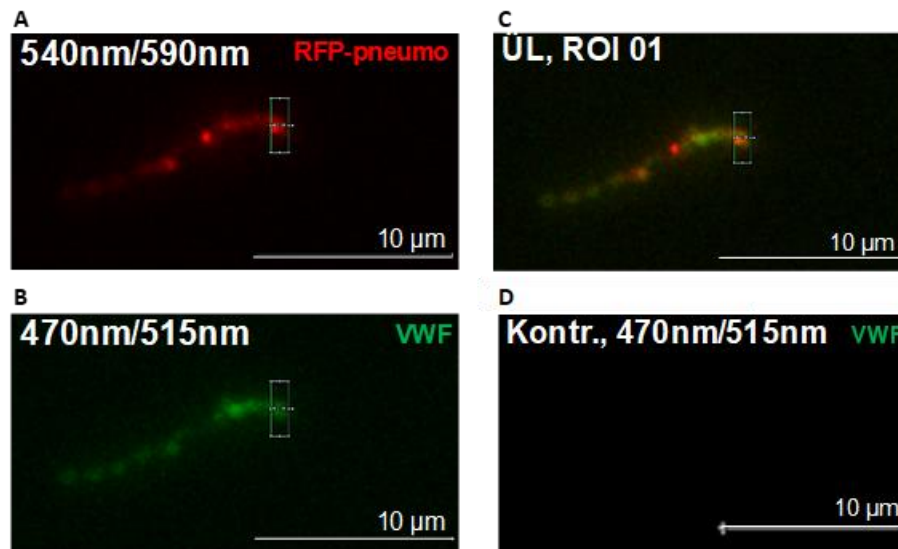


Abbildung 4-34: Antikörperkontrolle für VWF-präinkubierte und nicht präinkubierte Pneumokokken (PM40)

Dargestellt sind in (A) und (B) der roten Fluoreszenz- und grünen Fluoreszenz-Kanal, in (C) und (D) die Überlagerung beider Kanäle, sowie in (D) die Kontrollaufnahme des grünen Fluoreszenz-Kanals, wenn die Pneumokokken nicht mit 3 µg/mL VWF präinkubiert wurden. Bei der Überlagerung des grünen Fluoreszenz- mit dem roten Fluoreszenz-Kanal ist eine Überlagerung beider Signale durch die gelbliche Farbe in Teilbereichen in (C) zu erkennen. Während in (B) ein VWF-Signal im grünen Fluoreszenz-Kanal festgestellt werden konnte, ist dies nicht der Fall, wenn die Pneumokokken nicht mit VWF präinkubiert wurden (D). Alle Aufnahmen wurden mit einem 63-fachen Öl-Immersion-Objektiv mit einer Fluoreszenzbeleuchtung am Leica DMi8 aufgenommen und mit der Software LasX bearbeitet. Die Maßstabsbalken sind 10 µm lang. Im grünen Fluoreszenz-Kanal wird das Signal des FITC-konjugierten anti-VWF-Antikörpers detektiert, im roten Fluoreszenz-Kanal das RFP-Signal der PM40 Pneumokokken.

Insgesamt belegen die in der Flusskultivierung bei 10 dyn/cm² durchgeführten Infektionsstudien, dass Pneumokokken in Heparin-sensitiver Weise an filamentöse VWF-Multimere auf den Endotheloberflächen adhären und diese Adhärenz unter den gewählten Analysebedingungen bis zu 25 min stabil bleibt. Zudem rekrutieren Pneumokokken VWF, der nach Histamin Stimulation in das Medium sezerniert wurde und sind selbst in der Lage auch im Fluss die VWF-Sekretion zu initialisieren.

4.7. Auswirkungen der VWF-vermittelten Pneumokokken-Adhärenz im *in vivo* Modell der Zebrafischlarve

Um zu überprüfen, ob die VWF-vermittelte Anheftung von Pneumokokken an Endothelzellen zu Veränderungen in einem Gefäßsystem eines lebenden Organismus führt, wurde das Infektionsmodell der Zebrafischlarve verwendet. Das Zebrafisch *in vivo Modell* ist für diese Fragestellung sehr gut geeignet, da die Hämostase Faktoren einschließlich des VWF eine hohe sequenzbasierte, strukturelle und funktionelle Homologie zu denen des Menschen aufweist (Weyand und Shavit, 2014). Zudem wird dieses Modell seit vielen Jahren als geeignetes Modell zur Analyse von Blutgefäß- und Gerinnungserkrankungen, sowie zur Thrombogenese Forschung eingesetzt (Hanumanthaiah *et al.*, 2002). Das Zebrafischmodell wurde bereits vielfältig zur Analyse von Streptokokken Infektionen genutzt und wurde erfolgreich zu Untersuchungen von Virulenzfaktoren wie der Polysaccharidkapsel eingesetzt (Saralahti und Rämét, 2015). In Ergänzung zu den passenden physiologischen Rahmenbedingungen kommen technische Vorteile dieses Modells hinzu. So erleichtert die Transparenz der Zebrafischlarven eine mikroskopische Analyse in Echtzeit. Die hier vorgestellten Studien erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Prof. Köster vom Zoologie Institut der TU Braunschweig.

Nach Etablierung der geeigneten Infektionsparameter wurden die Untersuchungen zur VWF-vermittelten Pneumokokken-Adhärenz nach einem standardisierten Verfahren durchgeführt. Wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, wurden zwischen 400 und 600 RFP-exprimierende Serotyp 35A Pneumokokken (PM40) in die Herzkammer von sedierten 5-Tage alten Zebrafischlarven injiziert. Um die Bakterienzirkulation im Gefäßsystem der Fischlarven mikroskopisch beobachten zu können, wurden die RFP-exprimierenden Bakterien in Zebrafischlarven injiziert, deren Endothelzellmembran durch Transfektion mit einem mCherry-Fusionskonstrukt konstitutiv rot fluoreszierte ([TgCflkl1:mcherryCAAX], Kapitel 3.6.1). In Abbildung 4-35 IA-D ist das rot fluoreszierende Gefäßsystem in der Herzregion eines repräsentativen Larvenausschnitts nach Pneumokokken Injektion abgebildet. Die weißen Pfeile zeigen Pneumokokken, die sich im Gefäßsystem mit der Zirkulation verteilen. Mit einem gelben Pfeil sind Pneumokokken im Gefäßendothel markiert. Diese Region wurde in Abbildung 4-35 ID vergrößert und zeigt einzelne Bakterien innerhalb des rot fluoreszierenden Gefäßendothel 19 min nach der Injektion der Bakterien in das Herz. Es konnten keine großen Aggregate beobachtet werden innerhalb des Blutgefäßsystems. In einer Zeitreihe sollte ermittelt werden, wie lange die Pneumokokken adhären am Endothel im Blutstrom bleiben. Die Aufnahmen der Zeitreihe sind in Abbildung 4-35 II dargestellt. Die mikroskopische Visualisierung der dorsal

gelegenen Gefäße der Kiemenbögen lässt erkennen, dass rot-fluoreszierende Diplokokken Bakterien einzeln oder auch in Gruppen nach 10 min, 60 min und 90 min stabil an der Endothelwand der Gefäße anheften (Abbildung 4-35 IID-F, weiße Pfeile). Die Bakterien lassen sich aufgrund der eindeutigen Morphologie sehr gut vom ebenfalls in rot-fluoreszierenden Endothel unterscheiden. Die Nutzung von grün fluoreszierenden GFP-exprimierenden Pneumokokken war nicht zielführend, da das Larvengewebe eine hohe grüne Hintergrundfluoreszenz aufweist und im späteren Verlauf eine VWF-Detektion über den FITC-konjugierten anti-VWF-Antikörper stattfinden sollte.

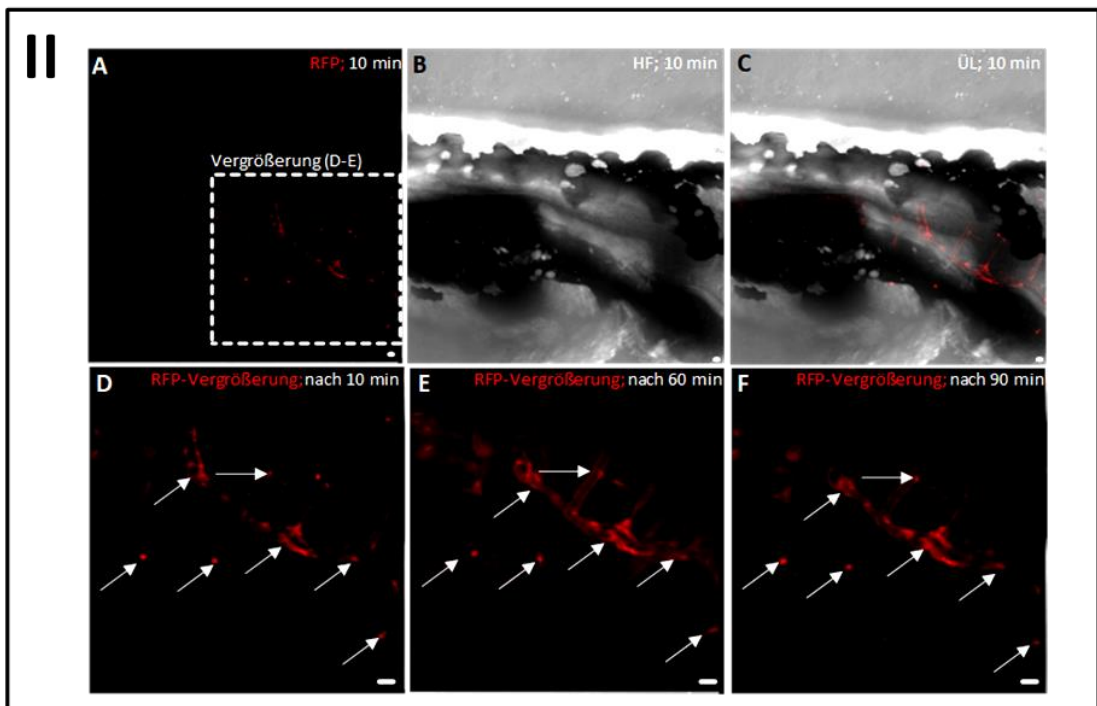
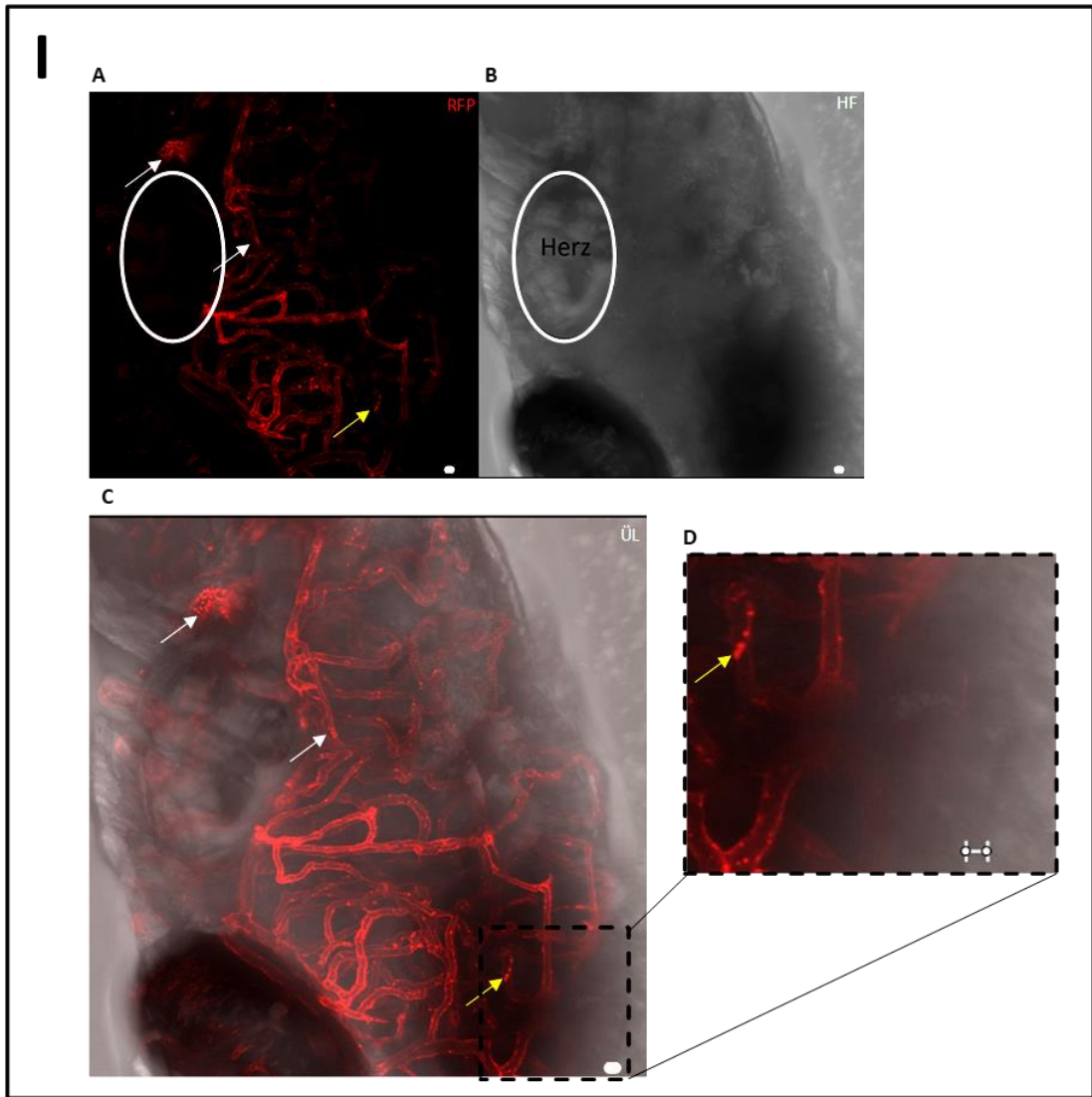


Abbildung 4-35: Verteilung der Pneumokokken nach der Injektion in das Herz der Zebrafischlarven

Die Bilddarstellung zeigt einen repräsentativen Ausschnitt eines Gefäßbereiches der Zebrafischlarve. In (I) ist eine Larve 19 min nach Injektion von RFP-exprimierenden Pneumokokken des Serotyps 35A (PM40) in die Herzkammer dargestellt. Sowohl in I als auch in II ist eine Zebrafisch-Mutante mit fluoreszierendem Endothel (TgCfkl1:mCherryCAAX) eingesetzt worden zur Visualisierung des Endothels. Die Nutzung GFP-exprimierender Bakterien war nicht zielführend, da das Larvengewebe eine hohe Eigenfluoreszenz im selben Wellenlängenbereich aufweist. (IA) zeigt die Herzregion (weiße Ellipse) und (IB) das Hellfeldbild im gleichen Bereich. Mit weißen Pfeilen sind in (IA) und (IC) Pneumokokken am Gefäßendothel hervorgehoben. In einer Ausschnittsvergrößerung (Dargestellt durch den Kasten in schwarz mit einer gestrichelten Linie) sind mit einem gelben Pfeil in (IA) und (IC) markierten Pneumokokken in einem roten Blutgefäß hervorgehoben. Die Ausschnittsvergrößerung in (ID) zeigt, wie sich diese Pneumokokken einzeln und aufeinanderfolgenden in einem Blutgefäß adhärent befinden. (IC) stellt die Überlagerung von roten Fluoreszenz- und HF-Kanal dar und es sind mit weißen Pfeilen, äquivalent zum roten Fluoreszenz-Kanal (IA) adhärente Pneumokokken an das Gefäß-Endothel gezeigt, die weitestgehend einzeln oder in losen Verbänden mit dem Endothel der Zebrafisch-larve interagieren. Die Pneumokokken haben sich weitestgehend gleichmäßig über das Blutgefäßsystem mit dem rot fluoreszierendem Gefäß-Endothel ausgebreitet. In (IIA) ist der roten Fluoreszenz-Kanal (RFP) dargestellt in der Region der Kiemenbögen. Das weiße Rechteck mit den gestrichelten Linien zeigt den vergrößerten Bereich für die Zeitreihe in IID, E und F auf für 10, 60 und 90 min nach der Infektion. In (IB) ist das Hellfeld (HF) und in (IC) die Überlagerung von roten Fluoreszenz- und Hellfeld-Kanal gezeigt 10 min nach der Infektion. Die weißen Pfeile in ID, E und F markieren Pneumokokken, die in einigen Bereichen im Gefäßendothel adhärent bleiben über den beobachteten Zeitraum von 80 min in der lebenden Zebrafischlarve. Die Maßstabsbalken sind unten rechts in den Abbildungen durch einen weißen Balken dargestellt und repräsentieren 10 µm. Die Aufnahmen wurden mit dem 20-fach-Wasser-Objektiv und der Fluoreszenzbeleuchtung am Leica DMI8 aufgenommen und mit der Software LasX bearbeitet. Für die Präinkubation wurden eine KBE von 400 für die Injektion eingesetzt.

Durch eine Injektion von RFP-exprimierenden Pneumokokken in Wildtyp Larven (WT Brassi PBS 0545) sollte analysiert werden, ob die in Abbildung 4-35 dargestellte Anheftung an das Larvenendothel durch endogen, aus dem Fischendothel sezerniertem VWF vermittelt wird. Hierzu sollten die Larven nach 2 h und 5 h fixiert und in einer DIF untersucht werden, in welchen Regionen der endogene Zebrafisch VWF zu lokalisieren ist im Zusammenhang mit den adhärenenten Pneumokokken.

Nach zwei-stündiger Larveninfektion mit Pneumokokken des Serotyp 35A-Stammes PM40 wurden die Larven in PFA fixiert und wie in Kapitel 3.6.3 einer DIF unterzogen. In Kombination von einem FITZ-konjugierten VWF-spezifischen Antikörpern und einem Pneumokokken-spezifischen Antikörpern in zusammen mit einem Alexa568-konjugierten Zweit-Antikörper konnten VWF-Moleküle an den Anheftungsstellen der Pneumokokken kolokalisiert werden. Diese Kolokalisation ist in Abbildung 4-36 am Beispiel eines repräsentativen Bildausschnittes nach Infektion dreier Larven gezeigt. Die weißen Pfeile zeigen die auf die Anheftungsstellen der Bakterien an den intersegmentalen Gefäßwänden, die durch die Rumpfmuskulatur führen (Abbildung 4-36, Larve 1), sowie in den herznahen Gefäßen (Abbildung 4-36, Larve 2) und auch in den Gefäßen der Kiemenbögen (Abbildung 4-36, Larve 3). Zudem bestätigen die Fluoreszenzsignalüberlagerungen der VWF-spezifischen grünen Fluoreszenz und der Pneumokokken-spezifischen roten Fluoreszenz eine Kolokalisation. Diese

Kolokalisation bestätigt die Rekrutierung von Zebrafisch-endogenen VWF an die Pneumokokken-Oberfläche und dessen Nutzung als Adhäsionskofaktor zur Endotheladhärenz in einem Blutgefäßsystem eines lebenden Organismus. Ergänzend zu den repräsentativen Mikroskopieaufnahmen wurden kurze Zeitverläufe der Bakterienzirkulation im Blutgefäßsystem aufgezeichnet, die auf der beiliegenden CD dieser Arbeit dargestellt sind (Video 1, 2 und 3). In Video 1 ist die Anheftung von RFP-exprimierenden Pneumokokken an das Gefäßendothel gezeigt. Video 3 zeigt das pulsierende Gefäß der in Abbildung 4-37 b dargestellten Zebrafischlarve (TgCflk1:mCherryCAAX). Video 2 zeigt die Überlagerung von Video Nr.1 und Nr.3.

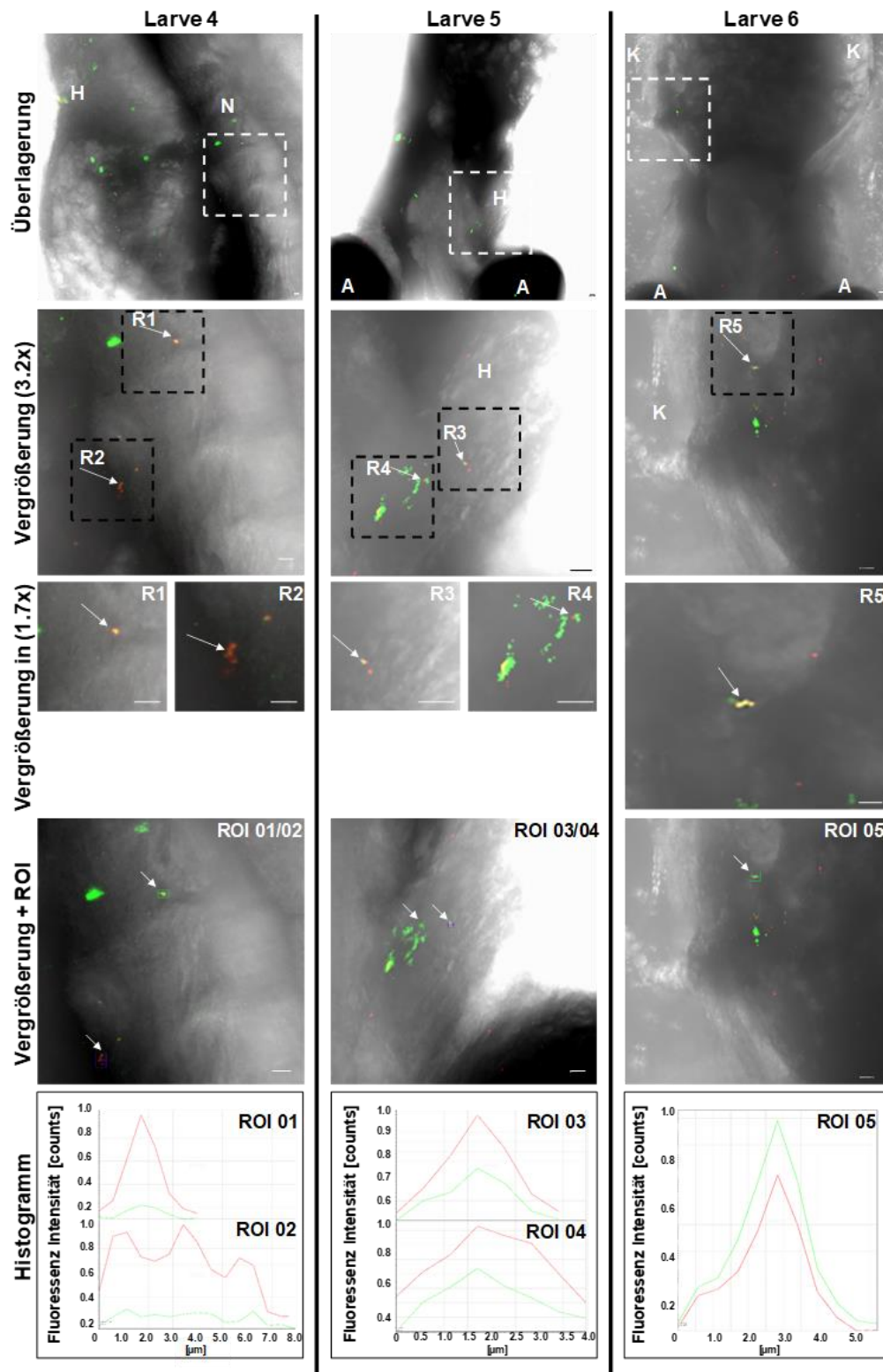


Abbildung 4-36: Kolokalisation der Pneumokokken (PM40) mit den endogenen VWF in Zebrafischlarven
 Die Mikroskopie der Pneumokokken Infektion nach DIF zeigt repräsentative Bildausschnitte dreier Larven (Larve 4, 5 und 6) und drei unterschiedliche Regionen innerhalb der Larven, in denen Pneumokokken mit endogenem VWF kolokalisieren nach einer DIF. Die Aufnahmen gliedern sich von oben nach unten. Die ersten Aufnahmen von oben stellen die Kolokalisation in räumlichen Bezug zur Larven-Region dar. Darunter dargestellt ist einen 3.2-fache und einen 1.7-fache Ausschnitts Vergrößerung (entspricht der in Schwarz bzw. Weiß dargestellten Rechtecke in den Übersichtsdarstellungen).

Mit Vergrößerung und ROI sind die Darstellungen gekennzeichnet, in denen die "region of interest" zur Erstellung der Fluoreszenzhistogramme markiert wurde. Diese zeigen in allen drei Fällen bzw. Larven eine Überlagerung des Signalhöhepunktes vom roten Fluoreszenz- mit dem grünen grünen Fluoreszenz-Signal. Diese Überlagerung spricht für eine Kolo-kalisation der Pneumokokken mit dem VWF. Die Maßstabsbalken sind unten rechts in den Abbildungen durch einen weißen Balken dargestellt und repräsentieren 10 µm. Die Aufnahmen wurden mit dem 20-fach-Wasser-Objektiv der Fluoreszenzbeleuchtung am Leica DMi8 aufgenommen und mit der Software LasX bearbeitet. Für diese Infektionen wurde Wildtyp-Fische-Larven der Linie WT Brassi PBS 0545 verwendet am Tag 5 nach der Befruchtung. Die Larven wurden 2 h nach der Infektion für die DIF fixiert. Für die Infektion wurden eine KBE von 400 für die Injektion eingesetzt. Pro Ansatz wurden mindestens 12 Larven infiziert. Zur Kontrolle der Injektions-Mortalität wurden 10 Larven nur mit Phenolrotlösung infiziert und überlebten die Injektion über 2 h.

Um mögliche Effekte der VWF-vermittelten Adhärenz auf die Endothelphysiologie visualisieren zu können, wurden Zebrafischlarven mit Pneumokokken nach Präinkubation mit 10 µg/mL VWF infiziert (siehe Methodenkapitel 3.2.4 und 3.6.2). Die Infektionsdosis betrug 600 Pneumokokken KBE/Larve. Nach einer Infektionsdauer von 5 h erfolgte die PFA-Fixierung der Larven, die nach DIF für die Mikroskopie eingebettet wurden. In Abbildung 4-37 a beschreibt das rote Quadrat die Lokalisation des in den übrigen Bildausschnitten dargestellten Mikroskopie Bereiches und Abbildung 4-37 b verdeutlicht den Verlauf der Gefäße in dieser Region anhand der Fluoreszenzaufnahme des identischen Bereichs in der Zebrafischmutante mit rot-fluoreszierendem Endothel. In Abbildung 4-37 B und C ist deutlich zu erkennen, dass es in den Gefäßen der Larven, die mit VWF-präinkubiert Pneumokokken infiziert worden waren zu Bakterienaggregat-Bildungen kommt, die einen Durchmesser von bis zu 10 µm aufweisen (Abbildung 4-37 B gelbe Pfeile, sowie C rote Pfeile). Dabei erscheinen bereiche der Aggregate in Gelb, was für eine Überlagerung mit dem Signal des FITC-konjugierten anti-VWF-Antikörpers spricht (Abbildung 4-37 C). Diese Bakterienaggregate werden ohne VWF-Präinkubation in den Larvengefäßen nicht ausgebildet (Abbildung 4-37, weiße Pfeile). Der dargestellte Larvenbereich befindet sich im hinteren Teil des Larvenschwanzes und liegt daher in räumlicher Entfernung zur Injektionsstelle am Herzen.

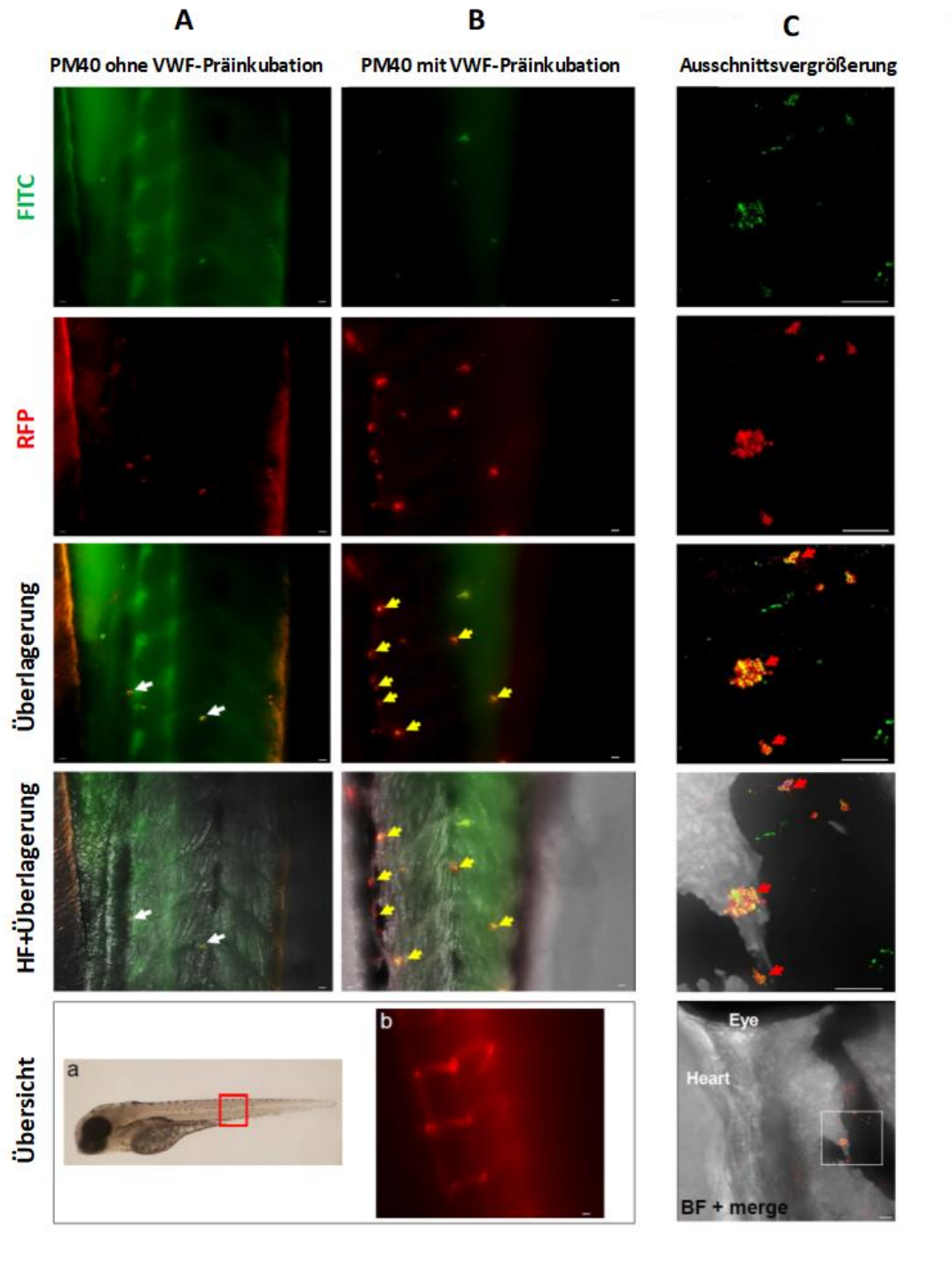


Abbildung 4-37: Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie von Zebrafischlarven nach Injektion von VWF-präinkubierten Pneumokokken

Nach der Injektion von 600 KBE VWF-präinkubiert Pneumokokken in 5-Tage alte Wildtyp-Zebrafischlarven (WT BRassi PBS 0545) erfolgte eine 5-stündige Inkubation im Zebrafisch. Das rote Quadrat in der Zebrafischdarstellung markiert den analysierten Mikroskopie Bereich (a). Die (b) zeigt den Gefäßverlauf in einer gleichalten transfizierten Larve, deren Endothel rot fluoresziert. Die Fluoreszenzaufnahmen in (A) zeigen die Adhärenz einzelner RFP-exprimierender Pneumokokken an das Gefäßendothel in Einzelkanälen und in der Überlagerung. In (B) ist die VWF-vermittelte Bildung von bakteriellen Aggregaten im Gefäßsystem gezeigt. In (C) sind Ausschnittsvergrößerungen gezeigt. Die Maßstabsbalken sind unten rechts in den Abbildungen durch einen weißen Balken dargestellt und repräsentieren 10 μm . Die Aufnahmen wurden mit dem 20-fach-Wasser-Obejktiv und der Fluoreszenzbeleuchtung am Leica DMi8 aufgenommen und mit der Software LasX bearbeitet. Die Larven wurden 5 h nach der Infektion für die DIF fixiert. Für die Präinkubation wurden 10 $\mu\text{g/mL}$ VWF und

eine KBE von 600 für die Injektion eingesetzt. Pro Ansatz wurden 20 Larven infiziert. Zur Kontrolle der Injektions-Mortalität wurden 10 Larven nur mit Phenolrotlösung infiziert und überlebten die Injektion über 5 h.

In weiteren Infektionsstudien sollte ermittelt werden, ob die durch VWF-Präinkubation der Bakterien hervorgerufene Ausbildung von Aggregaten in den Gefäßen zu einer Verminderung der Überlebensrate der Zebrafischlarven führt. Zu diesem Zweck wurden 600 KBE RFP-Pneumokokken in die Herzkammer der sedierten Zebrafische injiziert und die Überlebensrate über 18 h dokumentiert. Jeweils 50 Larven wurden mit VWF-präinkubiert Pneumokokken und jeweils 50 Larven wurden mit nicht-präinkubiert Pneumokokken infiziert. Abbildung 4-38 zeigt die Auswertung der Überlebensraten anhand der Kaplan-Meier-Darstellung. Sowohl die Infektion der Larven mit VWF-präinkubiert Pneumokokken, als auch die Infektion der Larven mit nicht-präinkubiert Pneumokokken führt zu einem Absterben von über 50% der Larven innerhalb von 18 h (Abbildung 4-38). Die in rot-dargestellte Abnahme der Überlebensrate nach Injektion von VWF-präinkubiert Pneumokokken ist tendenziell größer, als die der in schwarz dargestellte der Larvenzahl ohne-präinkubiert Pneumokokken (Abbildung 4-38). Während nach Infektion mit VWF-präinkubiert Pneumokokken nach 18 h nur noch 13 der 50 Larven am Leben waren, starben nach Injektion von nicht-präinkubiert Pneumokokken 31 von 50 Larven. Der Unterschied in der Anzahl überlebender Larven ist nach statistischer Auswertung mit dem Student's T-Test nicht signifikant, dennoch liegt ein tendenziell eindeutiger Unterschied vor, der in weiteren Studien näher untersucht werden soll.

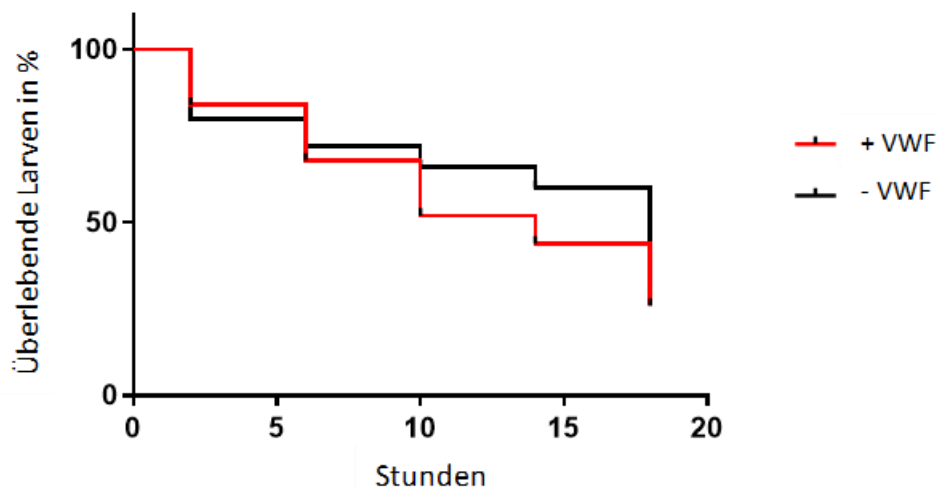


Abbildung 4-38: Überlebensrate von Zebrafisch-Larven nach Infektion mit VWF-präinkubierten Pneumokokken

Jeweils 600 KBE Pneumokokken (PM40) bzw. VWF-präinkubierten Pneumokokken wurden in die Herzkammer von 50 Zebrafisch-Larven injiziert. Die Anzahl der überlebenden Larven wurde nach 2, 6, 10, 14 und 18 h überprüft und anhand eines Kaplan-Meier-Darstellung mit der Graph-Pad Prism 7 Software visualisiert. In rot ist der Graph für die Infektion mit den präinkubierten Pneumokokken, in schwarz der für die ohne Präinkubation dargestellt. Zur Kontrolle der Injektions-Mortalität wurden 10 Larven nur mit Phenolrotlösung infiziert und überlebten die Injektion über 18 h.

Die Ergebnisse der *in vivo*-Infektionen der Zebrafischlarven zeigen die Rekrutierung von Zebrafisch-VWF an die Bakterienoberfläche und bestätigen eine VWF-vermittelte Anheftung der Pneumokokken an das Gefäßendothel im Blutstrom lebender Zebrafischlarven. Besonders hervorzuheben ist der Nachweis der Bildung von bis zu 10 µm umfassenden Bakterienaggregaten im larvalen Gefäßsystem nach Injektion von VWF-präinkubiert Pneumokokken in die Herzkammer der Zebrafische. Erste Analysen zum Einfluss der VWF-Präinkubation von Pneumokokken auf die Überlebensrate weisen auf eine tendenzielle Verringerung der Überlebensrate hin, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Insgesamt belegen die Infektionsstudien im Zebrafisch-Modell eine *in vivo*-stattfindende VWF-vermittelte Interaktion zwischen Pneumokokken und Gefäßendothel und bieten daher erstmals Erklärungsansätze für die pathophysiologischen Symptome im Zuge schwerer, systemischer Pneumokokken Erkrankungen.

5 Diskussion

Streptococcus-pneumoniae-Infektionen zählen trotz der Entwicklung von Konjugatimpfstoffen, die zumindest einen Teil der Serotypen abdecken, noch immer zu den lebensbedrohlichen Infektionserregern weltweit (Normark und Tuomanen, 2013; WHO, 2016). Sie kolonisieren in der Regel symptomlos als Kommensale auf den respirativen Epitheloberflächen des Nasenrachenraums, treten jedoch auch als Auslöser von lokalen Infektionen wie Otitiden und auch als Pneumonie- Sepsis- und Meningitiserreger in Erscheinung (Cartwright, 2002). Daher dienen vielfältige aktuelle Forschungsprogramme auf dem Gebiet der Pneumokokken-Wirt-Interaktionen zur Aufklärung der Faktoren, die zur Pathogenese im Menschen beitragen. Zur Etablierung im Wirt nutzen Pneumokokken eine Vielzahl an Adhärenzstrategien, die von einem breiten Spektrum an Oberflächenfaktoren vermittelt werden (Salyers und Whitt, 2001; Hammerschmidt, 2006). Hierbei erfolgt entweder eine direkte Bindung an zellulären Rezeptoren des Wirtsgewebes oder die Rekrutierung von Wirtskomponenten der extrazellulären Matrix und des humanen Plasmas wie z.B. Fibronektin, Vitronektin und Plasminogen (Bergmann und Hammerschmidt, 2006; Voss *et al.*, 2012).

Die vorliegende Arbeit ist auf die Aufklärung der Beteiligung und Funktion des Von Willebrand Faktors (VWF) im bakteriellen Infektionsprozess fokussiert. Bei dem VWF handelt es sich um ein Glykoprotein mit essenzieller Funktion in der Thrombozyten-Rekrutierung und in der endothelialen Verankerung der Blutplättchen in der Hämostase (Ruggeri *et al.*, 2007, Springer, 2014). Eine verringerte VWF-Produktion oder Punktmutationen im *vwf*-Gen führt zu einer Beeinträchtigung der physiologischen Funktion in der Koagulation. Die Folge sind mehr oder weniger starke Hämophilie-Erkrankungen, die innerhalb von mehreren Generationen über die männliche Linie weitervererbt werden (Ruggeri, 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse beleuchten zum einen die biochemische Interaktion mit der Eno, einem Oberflächenprotein der Pneumokokken, und zum anderen die Funktion des VWF als Adhärenzkofaktor in der Zellkultur und im *in vivo* Zebrafisch-Modell.

5.1. Charakterisierung und Vergleich der bakteriellen VWF-Bindungsproteine

Die Interaktion zwischen bakteriellen Pathogenen und VWF ist bislang nur wenig untersucht und wurde bis dato nur für *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus lugdunensis* beschrieben (Chavakis *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 2004). Die Ergebnisse der initialen Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem VWF zeigten erstmals, dass auch Pneumokokken unabhängig von ihrem

Serotyp VWF an ihrer Oberfläche binden. In Übereinstimmung mit den für Staphylokokken publizierten Daten reduziert sich die VWF-Bindungsaktivität mit Zunahme der bakteriellen Kapselexpression. Dennoch zeigen auch stark bekapselte Pneumokokken des Serotyps 2 eine VWF-Bindungsaktivität. Die Polysaccharidkapsel bestimmt aufgrund ihrer biochemischen Zusammensetzung den Serotyp und zählt zu den wichtigsten Virulenzfaktoren. Sie schützt die Bakterien vor einer Neutralisation durch professionelle Makrophagen (Hyams *et al.*, 2010). Hammerschmidt und Mitarbeiter konnten zudem zeigen, dass Pneumokokken die Kapseldicke zu Adhäsionszwecken reduzieren können, um die adhäsiven Eigenschaften der Oberflächenadhäsine freizulegen und Ligand-Rezeptor-Interaktionen zu verstärken (Hammerschmidt *et al.*, 2005).

Die vorliegenden Studien belegen, dass Pneumokokken nicht nur das Potenzial haben, globulären VWF aus der Blutzirkulation auf der Oberfläche zu binden, sondern auch an VWF-Fäden zu haften, die im Blutstrom unter Scherstress-Einwirkung auf den endothelialen Oberflächen durch autonome Multimerisation ausgebildet werden. Pneumokokken exprimieren oft mehrere Bindungsmoleküle für dasselbe Wirtsprotein. So interagieren sie mit dem Fibrinolyseprotein Plasminogen sowohl mit einer oberflächenassoziierten Eno (Bergmann *et al.*, 2001; 2003) als auch mit dem Cholin-bindenden Protein PspC (Meinel *et al.*, 2018). Anhand von 19 heterolog exprimierten und gereinigten Oberflächenproteinen erfolgte eine erste Überprüfung der VWF-Bindungsaktivität auf der Bakterienoberfläche. Es handelte sich hierbei einerseits um bereits sehr gut charakterisierte Adhäsine, aber auch um unbekannte Proteine, die über LPxTG-Aminosäure-Sequenzen in der Bakterienzellwand verankert sind. Die initialen Bindungsstudien ergaben für vier der 19 getesteten Proteine ein deutliches VWF-Bindungssignal, das auch in der densitometrischen Auswertung nach Abzug der unspezifischen Hintergrundbindung als positives Bindungssignal gewertet werden konnte. Zu den fünf VWF-bindenden Oberflächenproteinen zählen die oberflächen-assoziierte Eno, das Cholin-bindende Protein “Pneumokokken Surface Protein C“ (PspC) und eines seiner Derivate SH13 sowie die bislang funktionell charakterisierten Proteine SP_1326 und SP_0899. PspC wurde zu Beginn seiner Charakterisierung auch als Immunglobulin A-bindendes SpsA beschrieben (Hammerschmidt *et al.*, 1997; Elm *et al.*, 2004). Mittlerweile ist bekannt, dass es über die Heparinbindungsstelle mit dem EZM-Protein Vitronektin interagiert (Voss *et al.*, 2013). Darüber hinaus bindet PspC humanes Thrombospondin 1 (Binsker *et al.*, 2015; 2017). Als multiadhäsives Oberflächenprotein ist es für die adhäsiven Eigenschaften der Pneumokokken von essenzieller Bedeutung. Für SP_0899 ist lediglich bekannt, dass es sich hierbei um ein

Lipoprotein handelt, das aufgrund seines konservierten Lipobox-Motifs an der Oberfläche exponiert wird (Gómez *et al.*, 2018).

Da die Eno in vorangegangenen Studien der eigenen Arbeitsgruppe bereits als Plasminogen-Bindungsprotein beschrieben wurde und sowohl ihre Molekülstruktur als auch Plasminogenbindungsdomänen bekannt waren, wurde die VWF-Interaktion dieses Proteins im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Die Ergebnisse der Westernblot-Overlays, Dot-Spot-Overlays, MST- und SPR-Analysen identifizierten und verifizierten die bakterielle Eno als VWF-Bindungsprotein der Pneumokokken. Die Eno ist ein für den Pneumokokken-Metabolismus essenzielles Glykolyseenzym, das im Rahmen der Milchsäuregärung in der Glykolyse 2-Phosphoglycerin in PhosphoEnolpyruvat umwandelt (Pancholi, 2001; Spektrum Akademischer Verlag, 1999). Elektronenmikroskopische Visualisierungen mit Gold-konjugierten spezifischen Antikörpern bestätigten, dass dieses Enzym auch als sogenanntes „Moonlighting“-Protein auf der Oberfläche aller bislang getesteten Pneumokokkenserotypen exprimiert wird und sich sowohl auf der Zellwand als auch auf der Polysaccharidkapsel befindet (Bergmann *et al.*, 2001). Jüngste bislang unveröffentlichte Studien aus der Arbeitsgruppe um Prof. F. Götz (Universität Tübingen) geben Hinweise darauf, dass die Staphylokokken-Eno im Rahmen der Zellteilung an den Zellteilungssepten nach außen auf die Bakterienoberfläche gelangt (Mündliche Korrespondenz). Der Verankerungsmechanismus an der Oberfläche bleibt jedoch ungeklärt. In früheren Studien wurde die Eno bereits von der eigenen Arbeitsgruppe als Plasminogenbindungsprotein beschrieben und dessen hohe Relevanz in der Plasmin-vermittelten Degradation von Fibrinthromben und von EZM-Proteinen wie Laminin konnte im Detail nachgewiesen werden (Bergmann *et al.*, 2005; 2007; Fulde *et al.*, 2013).

Anhand eines Peptid-Arrays, der die gesamte Aminosäuresequenz der Enolase in 141 synthetische einzelne Peptidspots repräsentiert, konnte ein mögliches VWF-Bindungsmotif postuliert werden (¹⁹⁵YGAEIFHALKKILKS²¹⁰). Im Rahmen einer früheren Kooperation der Arbeitsgruppe mit Prof. Wolff-Dieter Schubert, HZI Braunschweig, konnte bereits 2004 die Molekülstruktur der Pneumokokk-Eno durch eine Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt werden (Ehinger *et al.*, 2004). Diese Analyse identifizierte die enzymatisch aktive Eno als Oktamer, das aus acht identischen Untereinheiten in einer ringförmigen Anordnung zusammengesetzt ist (Ehinger *et al.*, 2004). Die Computer-basierte Lokalisierung der mit dem Peptid-Array detektierten bis zu sieben möglichen VWF-Bindungsregionen in diesem Oktamer ergab, dass lediglich die Aminosäuren einer einzigen VWF-bindenden Region, des Bindungsmotif Nr.3, zum größten Teil auf der Moleküloberfläche exponiert sind. Die alpha-

helikalen Peptide dieser Region liegen an der Berührungskante zweier Eno-Monomere und bilden eine Molekülfurche, die sterisch genug Raum für das mehrere Megadalton umfassende, multimerisierte VWF-Molekül bietet. Im enzymatisch-aktiven Eno-Oktamer stünden daher vier potenzielle Bindungsfurchen für die Interaktion mit VWF zur Verfügung. Ein Vergleich zwischen den VWF-Bindungsdomänen der Pneumokokken-Eno und der des Protein A von *S. aureus* (SpA) offenbart deutliche strukturelle Gemeinsamkeiten (Abbildung 5-1, O'Seaghda *et al.*, 2006 und Deis *et al.*, 2015).

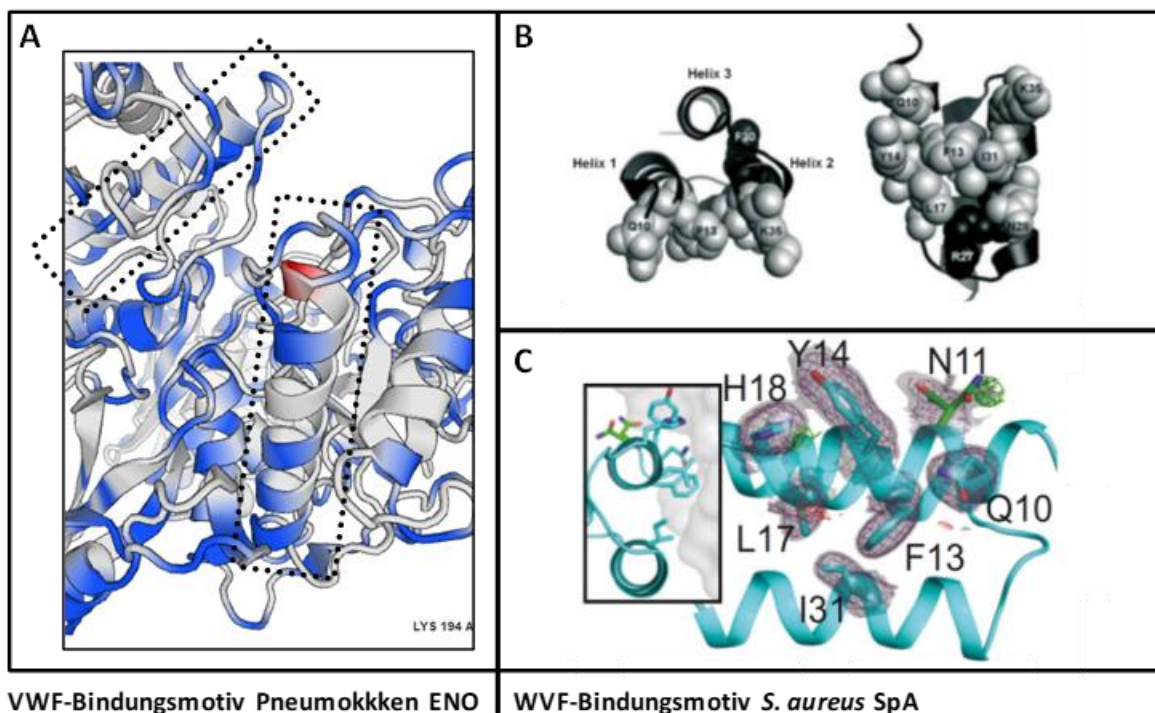


Abbildung 5-1: Darstellung der VWF-Bindemotive der Pneumokokken Eno (A) und des SpA von *S. aureus* (B+C)

(A) zeigt in rot markiert die Position des Lysins (K) 194 des „short Peptid“ Nr. 3., mit der Sequenz ¹⁹⁵YGAEIFHALKKILKS²¹⁰. Die zwei Rechtecke mit gestrichelten Linien markieren die sich gegenüber liegenden Helices von zwei Eno-Monomeren im Homodimer, die das VWF-Bindemotiv mit dem „short Peptid“ Nr. 3 enthalten. Positive Ladungen werden in dieser Darstellung in blau angezeigt. (B) Stellt das VWF-Bindemotiv für die A1-Domäne des SpAD von *S. aureus* dar. Die in Schwarz hinterlegten Aminosäuren F 30 und R 27 sind relevant für die VWF-Bindung. Die in Grau hinterlegten AS (Q10, F13, Y14, L17, H18, und I31) sind relevant für die F_C-Teil-Bindung. Das Motif besteht aus einem 1/2-Helix-Motif, aus Helix 1 und 2. Dieses Motif ist sowohl für die Bindung der VWF A1-Domänen, als auch für die Bindung des F_C-Teils zuständig. In (C) ist die unter anderem für die VWF-Bindung relevante Teilprotein-Kristallstruktur des SpAc vom SpA von *S. aureus* dargestellt. Die Röntgenkristallstruktur hat eine Auflösung von at 2.3 Å. Es handelt sich um das 1/2 Helix-Motif (in Cyan dargestellt), was unter anderem auch für die Bindung der VWF-A-Domäne verantwortlich ist. Die Ausschnittsvergrößerung mit dem Rechteck mit durchgezogenen Linien stellt in Grau die Interaktion mit einem F_C-Teil dar, der auch durch das Motif gebunden wird. Die Grenzflächen-Reste der Aminosäuren, die für die F_C-Teil Bindung relevant sind (Q10, F13, Y14, L17, H18, und I31) sind in Grau hinterlegt. Teilabbildung (A) wurde mit der Software SWISS-MODEL Repository erstellt. Teilabbildung (B) ist modifiziert nach O'Seaghda *et al.*, 2006. Teilabbildung (C) ist modifiziert nach Deis *et al.*, 2015.

Die VWF-Bindungsstelle wird in beiden Fällen von zwei gegenüberliegenden alpha-Helices gebildet, sodass die evolutionäre Entwicklung einer bakteriellen, Gattungs-übergreifenden und strukturell-determinierten VWF-Bindungstasche vermutet werden kann (Abbildung 5-1 A, hervorgehoben durch die Rechtecke mit gestrichelten Linien). Die beiden angrenzenden Helices stehen sowohl in der Eno als auch im SpA-Protein in vertikaler Ausrichtung relativ parallel zueinander (siehe schwarzer Kasten Abbildung 5-1 B+C). Im Falle der VWF-Bindung durch SpA konnten für beide in der VWF-Bindung-involvierten Helices die Aminosäuren Arginin 27 und Phenylalanin 30 ermittelt werden (Abbildung 5-1 B).

Weiterführende Studien sind notwendig, um das postulierte VWF-Bindungsmotif der Pneumokokken-Eno zu bestätigen und die für die Bindung essenziellen Aminosäuren zu identifizieren. Dies könnte durch Positions-spezifische Mutagenese einzelner Aminosäuren im heterolog-exprimierten Eno-Protein geschehen oder durch eine massenspektrometrische Analyse der Bindungsregion nach einer Kreuzverlinkung und anschließender sequenzieller Peptidproteolyse. Die Deletion eines größeren Peptidbereiches im Eno-Molekül ist problematisch, da es mit hoher Wahrscheinlichkeit durch das Fehlen mehrerer Aminosäuren zu strukturellen Instabilitäten kommt, die die Aussagekraft von Bindungsstudien stark herabsetzen würde. Als weitere Überprüfung ist in weiterführenden Studien die Herstellung von Pneumokokken-Stämmen geplant, die eine enzymatisch-intakte Eno mit Aminosäureaustauschen in der putativen VWF-Bindungsregion exprimieren. Die Mutagenese der Pneumokokken erfolgt hierbei anhand eines gut etablierten Protokolls, das die natürliche Kompetenz zur DNA-Aufnahme dieser Bakterienart ausnutzt. Durch VWF-Bindungsstudien mit diesen Stämmen kann festgestellt werden, welche Relevanz die Eno in der VWF-Bindung der Pneumokokken hat.

Diese biochemische Methode konnte bereits zur Charakterisierung der Plasminogenbindungsdomänen der Eno erfolgreich angewandt werden (Bergmann *et al.*, 2003). Neben den C-terminalen Lysinen konnte ein lineares Nonapeptid als Plasminogenbindungsmotif (²⁴⁸FYDKERKVY²⁵⁶) charakterisiert werden (Bergmann *et al.*, 2001; 2003). Bislang wurden weltweit nur drei bakterielle VWF-Bindungsproteine identifiziert. Es handelt sich um das LPxTG-verankerte Oberflächenprotein A (SpA) (Hartleib *et al.*, 2000), und das Protein vWBP (Bjerketorp *et al.*, 2002) von *S. aureus*, sowie das vWBL von *S. lugdunensis*, das von Nilsson und Mitarbeitern beschrieben wurde (Nilsson *et al.*, 2004). Hierbei konnte gezeigt werden, dass SpA kovalent mit der Zellwand über ein LPxTG-Motif verbunden ist. Für vWBP handelt es sich um keine bekannte, klassische Verankerung in der

bakteriellen Zellwand nachgewiesen werden. Darin liegt eine Gemeinsamkeit zur Eno, deren Art der Oberflächenverankerung ebenfalls noch nicht geklärt werden konnte (Bergmann *et al.*, 2005; Claes *et al.*, 2017). Das sekretierte vWBP komplexiert mit dem oberflächen-assoziierten ClfA und ermöglicht die Rekrutierung des VWF im Scherstress (Claes *et al.*, 2014, 2017). ClfA ist kovalent über die Transpeptidase Sortase A (SrtA) mit der Zellwand von *S. aureus* verbunden (Claes *et al.*, 2017) und vermittelt die Adhärenz an Endothelzellen über die Bindung von Fibrinogen und Fibronectin verantwortlich ist. Nach heterologer Expression des SpaA in *Lactococcus lactis* konnte gezeigt werden, dass die VWF-Bindung durch SpaA ausschließlich bei niedrigen Scherraten von (2,5 Dyn/cm²) stattfindet, während bei hohen Scherraten von 10 dyn/cm² die VWF-Interaktion unabhängig von SpA stattfindet (Pappelbaum *et al.*, 2013). Die VWF-Bindung an vWBP hat unter statischen Bedingungen keine hohe Relevanz (Thomer *et al.*, 2013). *S. aureus* exprimiert daher VWF-Bindungsproteine, die unterschiedliche Bindungseigenschaften in Abhängigkeit vom Scherstress aufweisen. Dies gilt auch für Pneumokokken die sowohl globulären VWF, als auch mechanisch elongierte, multimerisierte VWF Fäden Binden können bei einem Scherstress von 10 dyn/cm².

Bei Pneumokokken konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, das vergleichbar zu *S. aureus* sowohl eine Bindung des VWF unter statischen Bedingungen, als auch unter starken Scherkrafteinfluss von 10 Dyn/cm² stattfindet. In wieweit hierbei die Eno auch unter starken Scherkraft Einfluss für die VWF-Bindung zuständig ist, könnte über eine heterologe Expression der Pneumokokken Eno in *L. lactis* untersucht werden. Ebenso ist es geplant, das postulierte Eno-VWF-Interaktionsmotif über Positions-spezifische Mutagenese zu verändern und funktionelle Bindungsstudien anzuschließen.

Die nähere Charakterisierung der Bindungsdynamik durch SPR-Analysen erfolgte bislang nur für SpA und beschreibt eine Dissoziationskonstante von $1,49 \times 10^{-8}$ M (Hartleib *et al.*, 2000). Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung, wie der in eigenen SPR-Studien ermittelte Wert von $6,32 \times 10^{-8}$ M für die Eno-VWF-Interaktion. Die nanomolaren Dissoziationskonstanten weisen auf eine starke Bindung hin, die für physiologisch-relevante Interaktionen typisch ist. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte zusätzlich die Charakterisierung der Bindungskinetik zwischen der Eno und VWF mittels MST, da diese Methode im Gegensatz zur SPR-Technik keine Immobilisierung eines der beiden Interaktionspartner erfordert. Die Vorversuche zu dieser Messung ergaben jedoch, dass diese Methode keine Unterscheidung zwischen Multimerisierungen und der eigentlichen Bindungsreaktion erlaubt. Um Multimerisierungs-bedingte Artefakt Messungen seitens der Eno und auch seitens des VWF zu

vermeiden, musste auf ein GFP-markiertes, modifiziertes VWF-Monomer-Protein zurückgegriffen werden, das von Prof. Schneppenheim, Universitätsklinikum Eppendorf zur Verfügung gestellt wurde. Zudem wurde in aufwendigen Vorversuchen mit verschiedenen Konzentrationsreihen diejenige Eno-Konzentration ermittelt, bei der die Beeinflussung der Messergebnisse durch Multimerisierungen vernachlässigbar gering waren. Als weiterer Nachteil der MST-Technik ist anzumerken, dass die Thermophorese-Bestimmung eine Fluoreszenzmarkierung eines der Bindungspartner erfordert. Diese Markierung erfolgt mit unterschiedlicher Effizienz, reduziert die Menge an einsatzfähigem Protein und kann ebenfalls Auswirkungen auf die eigentliche Bindungsreaktion haben. Die durch MST-ermittelten Dissoziationskonstanten für die Interaktion zwischen der Eno und monomerem VWF lagen im Mittel bei $4,65 \times 10^{-9}$ M und bestätigten die mit der SPR- Technik gemessenen nanomolaren Bindungsparameter. Zudem ermöglichte die MST-Messung eine Bestimmung des Hill-Koeffizienten, der auf eine negative Kooperativität der Bindungsaktivität schließen lässt. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass VWF bereits als Monomer ca. 360 kDa umfasst und im multimerisierten Zustand ein Molekulargewicht von mehreren Megadalton aufweist. Die negative Kooperativität kann dadurch erklärt werden, dass die Bindung eines VWF-Multimers an eine der vier potenziellen Bindungsfurchen im Eno-Oktamer die Interaktion mit weiteren VWF-Multimeren rein sterisch immer mehr erschwert.

Bei dem VWF handelt es sich um ein mechanoresponsives Glykoprotein, das modulhaft aus mehreren Proteindomänen zusammengesetzt ist, von denen vor allem die mittleren Domänen A1, A2 und A3 für die physiologische Funktion des VWF von großer Bedeutung sind. Durch die Scherkrafteinwirkung im Blutstrom wird das Protein nach der Sekretion aus den WPB des Gefäßendothels in eine elongierte Form gezogen (Springer, 2014). Erst durch diese Scherstress-abhängige Konformationsänderungen werden Dimerisierungs- und Multimerisierungsstellen freigelegt, sowie wichtige Interaktionsstellen exponiert (Springer, 2014). Die in dieser Arbeit durchgeführten Dot-Spot- und SPR-Analysen identifizieren und bestätigen die VWF-Domäne A1 als Interaktionsstelle für die Pneumokokken-Eno. Die A1-Domäne vermittelt die Rekrutierung von Thrombozyten, indem es an das Thrombozytenprotein GpIb bindet (Springer, 2014; Lof *et al.*, 2017). Darüber hinaus erfolgt über die A1-Domäne die Verankerung des VWF an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix wie z.B. Heparin, Kollagene der Typen I, IV und VI sowie zu einem gewissen Ausmaß an Kollagen Typ III (Schneider *et al.*, 2007; Flood *et al.*, 2015). Die Bestimmung der Dissoziationskonstante der Eno-Bindung an die A1-Domäne des VWF lag mit $2,16 \times 10^{-8}$ M ebenfalls im nanomolaren Bereich. Dies lässt auf

eine starke Bindung schließen, sodass es sich bei der A1-Domäne wahrscheinlich um eine entscheidende Interaktionsstelle handelt, auch wenn eine Interaktion mit weiteren VWF-Domänen nicht ausgeschlossen werden kann. In Übereinstimmung zur hier beschriebenen Interaktion der Eno mit VWF, wurde die A1-Domäne des VWF auch als Bindungsstelle für *S. aureus* im Scherstress identifiziert (Pappelbaum *et al.*, 2013). Basierend auf ELISA-Analysen konnten ähnliche Bindungsparameter für die Interaktion des SpA von *S. aureus* mit VWF bestimmt werden. (O'Seaghdha *et al.*, 2006). Zudem bindet auch das vWbp von *S. aureus* mit hoher Affinität an die A1-Domäne (Claes *et al.*, 2017). Im Gegensatz zu den VWF-Interaktionen der *S. aureus*-Proteine zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, dass eine Scherstress-abhängige Auffaltung der A1-Domäne für die Interaktion mit Pneumokokken im Allgemeinen und mit der Eno im Besonderen nicht essenziell notwendig ist. Parallel zur Analyse der A1-Bindung wurden die VWF Domänen A2 und A3 einer Bindungsanalyse unterzogen, die jedoch mit negativen Ergebnissen abgeschlossen wurde. Die Überprüfung der Proteinqualität der einzelnen A-Domänen nach SDS-Gelelektrophorese ergab, dass die A2-Domäne sehr instabil ist und in kurzer Zeit große Degradationseffekte aufwies. Dies könnte sich auch negativ auf die Bindungsstudien ausgewirkt haben, wenngleich die Studien stets zeitnah und mit intaktem Protein durchgeführt worden sind. Die fehlende Eno-Bindung an die A3-Domäne könnte auf die globuläre Proteinkonformation beschränkt sein. Bindungsstudien in einem Scherstress-simulierenden Bioflux-System könnten aufzeigen, ob eine Scherstress-bedingte Elongation der A3-Domäne die Bindung an die Eno ermöglicht. Um zu klären, ob weitere Domänen des VWF an der Interaktion mit der Eno beteiligt sind, erfolgten initiale Bindungsstudien mit heterolog exprimierten VWF-Proteinen, deren A-Domänen deletiert waren. Aufgrund von unspezifischen Antikörperreaktionen und instabilen Proteinfractionen erbrachten diese Bindungsstudien leider keine eindeutigen Ergebnisse. Es sind jedoch weitere Untersuchungen geplant, um mit alternativen VWF-spezifischen Antikörpern nach weiteren Bindungsstellen zu suchen. Des Weiteren soll in zukünftigen funktionellen Studien geklärt werden, ob die Bindung der Eno an die A1-Domäne des VWF Auswirkungen auf dessen physiologische Bindungsfunktionen hat. Erste Anhaltspunkte für einen möglichen inhibitorischen Effekt der Eno-A1-Interaktion auf die Funktion des VWF konnten in Zellkultur-basierten Infektionsstudien gewonnen werden, die im Folgenden näher diskutiert werden.

5.2. Humaner VWF fördert die Phagozytose bei THP-1 Makrophagen-ähnlichen Zellen

Nachdem die VWF-Bindung von Pneumokokken gezeigt werden konnte und die Eno als Interaktionspartner näher charakterisiert wurde, sollte ein Einfluss auf die Phagozytose untersucht werden. Dazu wurde der schwach bekapselte Serotyp 35A, sowie die Makrophagen-ähnliche Zelllinie THP-1 ausgewählt.

Sowohl die Ergebnisse des Penicillins/Genatmicin-Protektionsassays als auch die der visuellen Quantifizierung nach der DIF zeigen, dass eine Präinkubation mit VWF die Phagozytose der Pneumokokken verstärkt. VWF-ummantelte Pneumokokken wurden signifikant stärker phagozytiert als Pneumokokken ohne Präinkubation. Ebenso zeigte sich eine Erhöhung der Anzahl adhärenter Pneumokokken, wenngleich diese Erhöhung nicht signifikant war. Die VWF-Präinkubation und Infektion erfolgt hierbei statisch, ohne Scherkräfteinwirkung auf den mechanosensitiven VWF. Die beschriebenen Effekte der VWF-Präinkubation auf die Phagozytose-Raten lässt vermuten, dass trotz der Rekrutierung des globulären, nicht-elongierten VWF an die Bakterienoberfläche eine Erkennung durch Makrophagen stattfindet. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass durch elektronenmikroskopische Analysen gezeigt werden (in Kooperation mit Prof. M. Rohde, HZI Braunschweig), dass in dem eingesetzten VWF sowohl kleine Filamente, als auch globuläres Protein vorliegt (siehe Abbildung 4-27, Kapitel 4.4) (Ruggeri, 2001). Somit treten beide Formen parallel auf, wobei die Häufigkeit der elongierten Form bei Einwirkungen von Scherkräften zunimmt. Auch wenn durch eine VWF-Präinkubation eine Erhöhung der Phagozytose Rate festzustellen ist, so kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine VWF-Ummantelung der Bakterien vor einer intrazellulären Neutralisation und Degradation schützt.

Es wurde bereits publiziert, dass VWF von Makrophagen in der Leber und der Milz zur Regulation der Hämostase phagozytiert und degradiert wird (van Schooten *et al.*, 2008). Die A1-Domäne des VWF vermittelt über die Bindung an das "low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1)" die Erkennung durch Makrophagen (Rastegarlarlari *et al.*, 2012; Wohner *et al.*, 2015). Diese Tatsache ist insofern bemerkenswert, als in meinen Eno-VWF-Bindungsstudien eine Interaktion mit der A1-Domäne nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse der THP-1-Studien zeigen daher, dass die Interaktion zwischen der Pneumokokken-Eno und der A1-Domäne des VWF nicht zu einer Hemmung der Erkennung durch Makrophagen führt.

Von Ercoli *et al.*, 2018 konnte gezeigt werden, dass Pneumokokken in der Lage sind nach der Aufnahme von Milz Makrophagen sich in diesen zu replizieren anstatt lysiert zu werden. Im Zusammenhang mit einer schweren Bakteriämie wird ein Großteil der im Blut zirkulieren Pneumokokken von CD169+ Makrophagen aufgenommen und lysiert. Jedoch konnte gezeigt werden, dass ein kleiner Teil der Pneumokokken-Population die Phagozytose übersteht und sich sogar innerhalb der Makrophagen replizieren kann (Ercoli *et al.*, 2018). Dies konnte auch in *ex vivo* Versuchen mit in der Schweinemilz validiert werden. Die Schweinemilz hat eine vergleichbare Mikroanatomie zu der menschlichen Milz (Fairbairn *et al.*, 2011 und Meurens *et al.*, 2012).

In einem *in vivo* Zebrafisch Meningitis-Modell konnten Jim *et al.*, 2016 aufzeigen, dass nach einer Injektion von Serotypen 2 Pneumokokken des Stammes D39 die Makrophagenanzahl am Infektionsherd zuerst konstant anstieg und anschließend drastisch reduziert wurde. Dabei wurden die Makrophagen mit einem L-Plastin Antikörper gefärbt, um deren Position und Anzahl über die Zeit zu bestimmen. Die zwei Tage alten Zebrafischlarven (2 „dpf“) wurden durch Injektion in das Liquor des Hirnstammes mit den Pneumokokken infiziert. Dort vermehrten sich die Bakterien und migrierten in den Subarachnoidalraum. Während die Anzahl an Pneumokokken kontinuierlich zunahm, nahm die Anzahl an Makrophagen im Verlauf der Infektion über 36 h ab. Verglichen wurde hierbei eine D39 *wt* mit der D39 Pneumolysin Mutante (*Aply*). Dabei zeigte sich bei einer Infektion mit einer KBE von 600 der Makrophagen-reduzierende-Effekt nur beim D39 *wt*. Die Reduktion der Makrophagen-Anzahl wurde in Verbindung gebracht mit der zytotoxischen Wirkung des Pneumolysis. Basierend auf diesen Beobachtungen wäre es denkbar, dass nach der VWF-vermittelten verstärkten Phagozytose der Pneumokokken diese Makrophagen durch die intrazelluläre Pneumolysin-Aktivität abgetötet werden. Weitere Infektionsstudien in der Zellkultur oder im *in vivo*-Zebrafischmodell könnten zeigen, ob die VWF-Inkubation diesen von Jim *et al.*, 2016 beschriebenen Effekt in irgendeiner Weise beeinflusst.

Um jedoch physiologische Aussagen darüber treffen zu können, welchen Effekt eine VWF-Präinkubation auf die phagozytierten Pneumokokken hat, sollten z.B. Makrophagen aus Vollblut isoliert werden und diese z.B. in dem Flusskultivierungssystem von der Firma ibidi® mit den VWF-präinkubierten Pneumokokken konfrontiert werden. Damit würden sowohl adäquate Makrophagen eingesetzt, als auch ein natürlicheres Milieu geschaffen werden vor allem, wenn zudem als Medium z.B. Citrat Blut eingesetzt werden würde. Hier wäre es in zukünftigen Untersuchungen möglich, das Schicksal der Pneumokokken mit VWF-

Präinkubation zu vergleichen zu denen ohne Präinkubation im Phagozytose-Assay mit Hilfe der RFP-exprimierenden Pneumokokken in Echtzeit zu verfolgen. Die Vitalität der Pneumokokken könnte in Echtzeit in diesem Versuchsaufbau durch die konstante RFP-Fluoreszenz der Pneumokokken innerhalb der THP-1 überprüft werden.

Zusammengenommen konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass eine Präinkubation der Pneumokokken mit VWF zu einer Signifikant erhöhten Phagozytose-Rate führt und ebenso die Adhärenz an THP-1 Makrophagen erhöht wird.

5.3. Einfluss der bakteriellen VWF-Interaktion auf die zelluläre Adhäsion

Der Von Willebrand Faktor zirkuliert im Blutgefäßsystem in einer Konzentration zwischen 6,0 µg/mL und 14 µg/mL (Spiel *et al.*, 2008). Im Zuge von bakteriellen Infektionen und verschiedenen Entzündungsprozessen kann sich die VWF-Konzentration jedoch temporär verdoppeln und wird zudem als Marker für vaskuläre Erkrankungen diagnostiziert (Spiel *et al.*, 2008; Springer, 2014). In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die Adhärenz von Pneumokokken an humanes Nabelschnur- und Lungenendothel als auch minimale Mengen des bakteriellen Zytotoxins Pneumolysin zu einer Exozytose von WPB führt (Lüttge *et al.*, 2012). Diese spezialisierten Endothelvesikel enthalten große Mengen VWF, der als erste Regenerationsmaßnahmen bei Gewebsschädigungen im Zuge der Exozytose freigesetzt wird und die Rekrutierung von Thrombozyten an den Ort der Infektion vermittelt (Spiel *et al.*, 2008). Zudem dient VWF als Trägermolekül für Faktor VIII, der zur Stabilisierung der Thrombenbildung von essenzieller Bedeutung ist (Springer, 2014). Die Entzündungs- und Infektions-bedingte Erhöhung der VWF-Konzentration im humanen Plasma ist direkt mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert, die auf eine Dysregulation der endothelialen Hämostase zurückzuführen sind (Sakai *et al.*, 2000). Zu diesen kardiovaskulären Komplikationen zählen unter anderem Myokardinfarkte, Verschlüsse der Herzkranzgefäße und arterielle Thrombosen (Gragnano *et al.*, 2017). Zudem verweisen kürzlich publizierte klinische Fallstudien und Tierversuchsanalysen auf eine Entzündungs-assozierte Dysbalance im Mengenverhältnis zwischen VWF und ADAMTS 13 hin (Kawecki *et al.*, 2017). Bei ADAMTS-13 handelt es sich um eine als „a desintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13“ bezeichnete VWF-spezifische Protease, die durch eine hoch regulierte Proteolyse die Thrombus-generierende Eigenschaft des VWF reguliert und eine ungesteuerte Thrombose verhindert (Springer, 2014). Die proteolytische Dysbalance führt

zu vermehrter Thromboseneigung und disseminierter intravaskulärer Koagulation (Spiel *et al.*, 2008; Kawecki *et al.*, 2017).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellkultur-basierten Studien charakterisieren VWF als Adhäsionskofaktor, der in konzentrationsabhängiger Weise die Anheftung der Bakterien an Endothelzellen vermittelt. Der adhäsionsfördernde Effekt tritt sowohl nach Präinkubation der Bakterien, als auch nach Präinkubation der Endothelzellen auf. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die VWF-Bindung an die bakteriellen Proteine über andere VWF-Domänen erfolgt als zur Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren. Die VWF-Verankerung an die Endothelzelloberfläche könnte z.B. über $\alpha V\beta 3$ - oder $\alpha IIb\beta 3$ -Integrine des Endothels erfolgen. Diese Integrine wurden bereits als VWF-Rezeptoren beschrieben und interagieren spezifisch mit der RGD-Aminosäuresequenz der C-terminalen C2-Domäne des VWF (Ruoslahti, 1991). Die RGD-Sequenz besteht aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Aspartat, die von spezifischen RGD-Bindungsstellen der Integrine erkannt werden. Um zu klären, ob eine RGD-vermittelte VWF-Lokalisation an die Endothelzelloberfläche an der Bakterienadhärenz beteiligt ist, wurden Inhibitionsstudien mit synthetisch-produzierten RGD-Peptiden durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Anzahl adhärierter Pneumokokken zeigt, dass nach Zugabe von RGD-Peptiden keine Reduktion der VWF-vermittelten Bakterienadhärenz festzustellen ist. Dieses Ergebnis könnte daraufhin deuten, dass keine Integrine, sondern andere Zelloberflächenrezeptoren an der VWF-vermittelten Interaktion beteiligt sind. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte für die VWF-vermittelte Adhärenz von *S. aureus* eine maßgebliche Beteiligung der endothelialen $\alpha IIb\beta 3$ -Integrine nachgewiesen werden (Casari *et al.*, 2013). In weiterführenden Infektionsstudien zur VWF-vermittelten Adhärenz ist geplant, transfizierte Endothelzellen zu verwenden, deren Oberflächenrezeptoren systematisch deletiert sind. VWF verfügt in der A1-Domäne über eine Heparinbindungsstelle. Heparin ist ein gerinnungshemmendes Glykosaminoglycan, das eine sterische Blockierung der GPIIb-abhängigen Thrombzytenbindung herbeiführt, wodurch keine stabile Thrombenbildung mehr möglich ist (Fujimura *et al.*, 1986). Die Zugabe von Heparin in Zellkulturinfektionsanalysen führte zu einer signifikanten Reduktion der bakteriellen Adhärenz an die Endothelzelloberfläche. Dieses Ergebnis wird als Hinweis auf eine Beteiligung der A1-Domäne des VWF an dessen Funktion als Adhäsionskofaktor interpretiert (Fujimura *et al.*, 1986). Abbildung 5-2 A zeigt eine schematische Darstellung der VWF Domänen mit der Heparinbindungsstelle, der Bindungsstellen für Kollagene, sowie das RGD-Motif. Zudem stellt die Ausschnittsvergrößerung die Domänen A1, A2 und A3-Domäne mit dem Interaktionsmotif

für das GPIb der Thrombozyten (GPIb) dar. In Abbildung 5-2 B sind die Konsequenzen einer Heparin-vermittelten Blockierung der Thrombozytenbindung gezeigt.

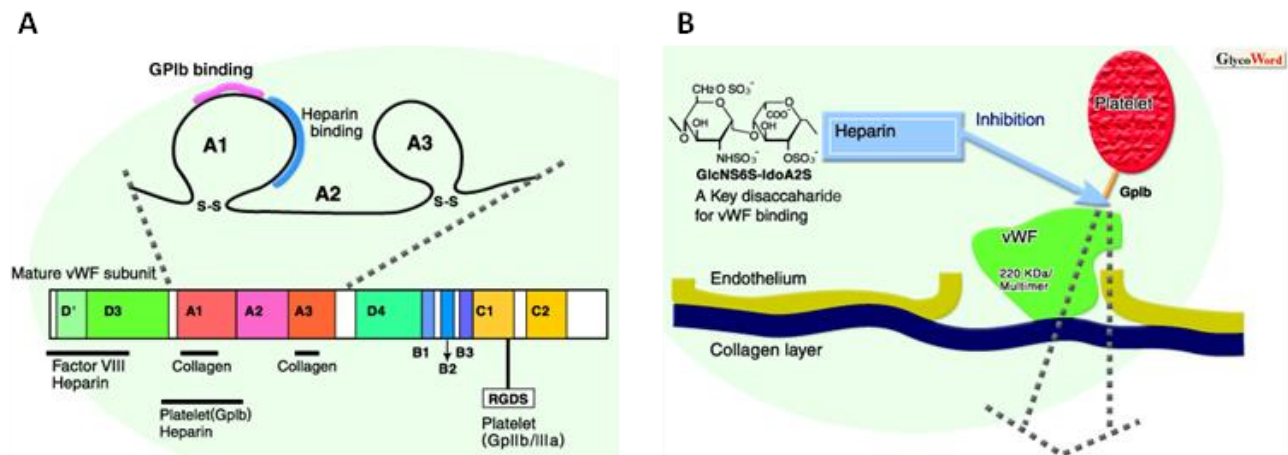


Abbildung 5-2: Interaktionsstellen und Domänenstruktur des VWF sowie die schematische Darstellung der Funktion bei Gefäßverletzungen

In (A) sind die unterschiedlichen Domänen und Interaktionsbereiche des humanen VWF dargestellt. Hervorgehoben ist der Bereich der VWF-A-Domänen sowie die GPIb-Bindungsstelle in pink und die Heparin-Bindungsstelle in hellblau in einer Ausschnittsvergrößerung. In (B) ist die schematische Bindung des VWF sowohl an das Kollagen der extrazellulären Matrix, als auch an das Endothel dargestellt bei gleichzeitiger angedeuteter Bindung der Thrombozyten (Platelet) an der GPIb-Bindungsstelle des VWF. Diese wird durch das Heparin, genauer durch dessen Disaccharid (GlcNS6-IdoA2S) unterbunden. (A) und (B) modifiziert nach Yasuo Suda (Graduate School of Science Osaka University).

Die Infektionsstudien zur VWF-vermittelten Pneumokokken-Adhärenz wurden mit Nabelschnurendothelzellen durchgeführt, die in der Forschungsgemeinschaft als Modellsystem für Endothelinteraktionen anerkannt sind und vielfältig verwendet werden (Kvietys und Granger, 1997; Onat *et al.*, 2011). Um einen hohen Differenzierungsgrad der humanen Zellen zu gewährleisten, wurden ausschließlich primär-isolierte Zellen einer frühen Passage verwendet und nur bis zur Subkonfluenz kultiviert. In diesem Zustand sollte nahezu keine endogene VWF-Ausschüttung erfolgen, da die Anzahl der WPB direkt mit dem Konfluenz-abhängigen Zell-Zell-Kontakt korreliert. Vorangegangene Studien wiesen zudem nach, dass die Ausschüttung von VWF auch ohne Zugabe des Entzündungshormons Histamin durch die Anheftung von Pneumokokken an Endothelzellen und auch durch das Zytotoxin Pneumolysin induziert werden kann (Lüttge *et al.*, 2012). Um zu überprüfen, ob durch Histamin-Zugabe eine Erhöhung der VWF-Ausschüttung erfolgt, die sich auf die VWF-vermittelte Pneumokokken-Adhärenz auswirkt, erfolgten Infektionsstudien nach Zugabe von Histamin. Die Quantifizierung der bakteriellen Adhärenz pro Endothezelle ergab keine signifikante Erhöhung der Adhärenz (Abbildung 4-20).

Die im Verlauf der biochemischen Analysen lokalisierten putativen VWF-Interaktionsstellen liegen im oktameren Eno-Molekül in einem räumlichen Abstand zu dem in älteren Studien charakterisierten Plasminogen-Bindungsmotif. Um zu analysieren, ob das lineare Plasminogen-Bindungsmotif an der VWF-vermittelten Bakterienadhärenz in den Zellkultur-Infektionsstudien beteiligt ist, erfolgten Inhibitionsanalysen nach Präinkubation der Bakterien mit zwei synthetischen Peptiden.

Als potenzielle Bindungsmodulatoren wurde das „short peptide“ (=kurzes Peptid) und „long peptide“ (=langes Peptid) der Eno sowie das Plg-Bindungspeptid eingesetzt. Dabei handelt es sich um Proteinsequenzen der Pneumokokken Eno, die in der vorliegenden Arbeit als potenzielle Interaktionsmotife ermittelt wurden, oder bei dem Plg-Bindungspeptid um ein schon publiziertes Interaktionsmotif bei der Eno mit Plasminogen (Bergmann *et al.*, 2001; Bergmann *et al.*, 2003; Kolberg *et al.*, 2006). Das „short peptide“ ist neun Aminosäuren kürzer, als das „long peptide“ des postulierten Eno-VWF- Interaktionsmotifes. Es zeigte sich beim Einsatz in der Dualinkubation kein Unterschied zwischen den Peptiden und keine Inhibition der Adhärenz. Dies kann damit zu erklären sein, dass neben der Eno ein redundantes System aus mindestens drei anderen Oberflächenproteinen vorhanden ist bei Pneumokokken, die VWF binden. Zum anderen kann es auch damit zusammenhängen, dass für die Bindung des globulären und des filamentösen VWF, ähnlich wie bei *S. aureus*, unterschiedliche Pneumokokken Proteine verantwortlich sind. Das Plg-Bindungspeptid ist repräsentiert durch die publizierte Plasminogenbindungssequenz „FYDKERKVYD“ (Bergmann *et al.*, 2001; Bergmann *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien zeigen hier, dass eine Blockierung der Plasminogenbindungsstelle am Eno-Molekül auf der Bakterienoberfläche keine Auswirkung auf die VWF-vermittelte bakterielle Adhärenz hat.

Die Aufklärung von Pathomechanismen im Rahmen der Grundlagenforschung hat auch die Entdeckung neuer Antiinfektiva zum Ziel. Ein bei Pneumokokkeninfektionen in der medizinischen Therapie häufig eingesetztes Sekretolytikum ist N-Acetylcystein. Es wirkt schleimlösend und weist eine antioxidative Wirkung auf (Santus *et al.*, 2014). Nach Zugabe des Sekretolytikums in den Infektionsanalysen konnte eine deutliche Reduktion der VWF-vermittelten Adhärenz verzeichnet werden. Da es sich um ein sehr kleines Molekül handelt, ist eine direkte Bindungsinhibition unwahrscheinlich. Es ist eher zu vermuten, dass die antioxidative Aktivität die Rezeptor-Zusammensetzung der Endothezelloberfläche verändert. Hierbei ist anzumerken, dass sämtliche in den Inhibitionsanalysen eingesetzten Bindungsmodulatoren keinen hemmenden Effekt auf das Wachstum der Bakterien zeigten, so

dass eine Beeinträchtigung der bakteriellen Fitness bei keiner der durchgeführten Inhibitionsstudien mit Bindungsmodulatoren vorlag.

Die mikroskopische Auswertung der differenziellen Immunfluoreszenzfärbung ergab weiterhin, dass die VWF-Präinkubation zwar eine Erhöhung der bakteriellen Adhärenz zur Folge hatte, jedoch keine Steigerung der Internalisierung nach sich zog. Dieses Ergebnis ist insofern ungewöhnlich, als die VWF-vermittelte Adhärenz von *S. aureus* ebenfalls zu einer erhöhten Internalisierung führt (Casari *et al.*, 2013). Zudem fördern sämtliche bislang publizierte Adhäsionskofaktoren auch die bakterielle Internalisierung. Neben der Fibronektin- und Vitronektin-vermittelten Invasion, konnte auch für die Plasmaproteine Plasminogen- und Thrombospondin eine unmittelbar auf die erhöhte Adhärenz folgende Internalisierung nachgewiesen werden (Bergmann *et al.*, 2004, Bergmann *et al.*, 2005; Holmes *et al.*, 2001; Bergmann *et al.*, 2009). Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer VWF-vermittelten Bakterienaufnahme in die Endothelzellen liegt wahrscheinlich in der physiologischen Funktion des VWF. Während die oben genannten Proteine der extrazellulären Matrix und des Plasmas kontinuierliche über eine Integrin-vermittelte Zytoskelett-Reorganisation in die Zellen internalisiert werden, erfolgt die Neutralisierung des VWF über die Phagozytose durch Makrophagen (Ruggeri *et al.*, 2007). Eine durch VWF-stimulierte Internalisierung in das Endothel wäre für eine physiologische Verankerung der Thrombozyten mit der subendothelialen Matrix eher kontraproduktiv (Ruggeri *et al.*, 2007).

5.4. Bedeutung der Scherstress-induzierten VWF-Elongation für die Interaktion mit Pneumokokken und Auswirkung der VWF-vermittelten Adhärenz im komplexen *in vivo* System

Als mechanosensitives Protein ändert VWF unter Scherstress-Einwirkung z.B. im Blutstrom seine Proteinkonformation und multimerisiert zu langen Proteinfäden (Ruggeri, 2007; Springer, 2014). Diese Konformationsänderung führt zur Exposition von Bindungsstellen, die zuvor unzugänglich waren. Um zu überprüfen, inwiefern sich diese Konformationsänderung auf die Interaktion mit Pneumokokken auswirkt, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Etablierung eines Flusskultivierungssystems der Firma ibidi®. Dieses System ermöglicht die Kultivierung von Nabelschnurendothelzellen über 48 h bei einem genau definierten, konstanten Scherstress von 10 dyn/cm², der zur Ausbildung von VWF-Fäden notwendig ist. Diese Scherstressrate entspricht der durchschnittlichen Rate einer Kopfarterie eines Erwachsenen (Reneman und

Hoeks, 2008). In einem durchschnittlichen Gefäßsystem werden Scherstressraten zwischen 3–13 dyn/cm² in den Mikrogefäßen und 25–70 dyn/cm² in der Körperaorta erreicht (Reneman und Hoeks, 2008). Nach Stimulation der VWF-Sekretion durch Histamin konnte durch fluoreszenzimmunologische Detektion in Echtzeit die Bildung von über 100 µm langen VWF-Fäden auf den Endothelzellen beobachtet werden. Die Zugabe von RFP-exprimierenden Pneumokokken des Serotyps 35A führte nach ca. 60-minütiger Zirkulation im Flusssystem zu einer Anheftung an die VWF-Fäden. Zudem rekrutierten die Bakterien auch zirkulierende globuläre VWF-Proteine an ihrer Oberfläche. Die Adhärenz an die VWF-Fäden zeichnete sich durch eine hohe Stabilität auf, da sie über einen Zeitraum von 25 min unter gleichbleibendem Scherstress zu beobachten war. Diese starke und Scherstress-resistente Anheftung der Pneumokokken an die VWF-Proteine auf den aktivierten Endothelien bietet sicherlich einen Vorteil für den bakteriellen Infektionsprozess, da es die Bakterien vor einer mechanischen Ablösung mit dem Blutstrom schützt und die Verweildauer in der Blutzirkulation erhöht. Auch ohne vorherige Histamin-Stimulation wurde eine VWF-Fadenbildung mit anschließender Pneumokokkenanheftung beobachtet. Dies erfolgte jedoch mit deutlich geringer Anzahl und erst nach ca. 90-minütiger Bakterienzirkulation. Hitzeinaktivierte Pneumokokken konnten nicht mehr an die VWF-Fäden adhären. Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass temperatursensitive Bindungsproteine die Adhärenz an die VWF-Fäden vermitteln. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der statischen Zellkulturinfektion konnte die Pneumokokkenanheftung an die VWF-Fäden auch in der Flusskultivierung durch Heparin signifikant reduziert werden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die in der A1-Domäne-lokalisierte Heparin-Bindungsstelle nicht nur in der statischen Zellkultur, sondern auch in der durch Scherstress elongierten Domäne an der Pneumokokkenbindung beteiligt ist (Fujimura *et al.*, 1986). In vergleichbaren Flusskulturstudien zur Staphylokokkenadhärenz an VWF-Fäden konnte eine signifikante Steigerung der Anzahl adhärenter Bakterien nachgewiesen werden, wenn aus Vollblut-isolierte Thrombozyten zusätzlich im Flusssystem zirkulierten (Pappelbaum *et al.*, 2013). Dieser die Adhärenz verstärkende Effekt wird auf die Interaktion der Staphylokokken mit dem Glykoprotein GPIIb/IIIa der Thrombozyten zurückgeführt (Sullam *et al.*, 1996 und Niemann *et al.*, 2004). Zudem weisen die VWF-Fäden nach Stabilisierung durch Thrombozyten einen größeren Durchmesser auf und bieten demzufolge eine größere Bindungsfläche (Pappelbaum *et al.*, 2013). In zukünftigen Studien soll untersucht werden, ob die Zugabe von Thrombozyten auch die Bindung von Pneumokokken an VWF-Fäden beeinflusst. In diesem Zusammenhang gewinnt das Oberflächenprotein PspC an Bedeutung, da

es humanes Thrombospondin 1 bindet, dessen Konzentration temporär im Zuge von Gefäßverletzungen von 20-300 ng/mL bis auf 30 g/mL ansteigen kann (Raugi *et al.*, 1982). Thrombospondin verfügt über eine N-terminale Heparin-Bindungsdomäne, gefolgt von einer Oligomerisierungsdomäne und einer VWF-Bindungsdomäne (Binsker *et al.*, 2015). Da PspC sowohl Thrombospondin als auch VWF bindet, könnte es sich um ein wichtiges Brückenmolekül handeln in der Interaktion zwischen Pneumokokken, VWF und Thrombozyten.

Die beschriebenen Zellkultur-basierten Analysen stellen vereinfachte Infektionsmodelle dar, die trotz der Simulation eines Flüssigkeitsstromes kein komplexes Blutgefäßsystem mit all seinen Komponenten repräsentieren können. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen der VWF-vermittelten Endotheladhäsion ergänzend in Kooperation mit Prof. Köster, TU Braunschweig *in vivo* in einem Zebrafisch-Modellsystem analysiert. Das Endothel des Zebrafisches weist starke morphologische und funktionelle Homologien zum humanen Endothelgewebe auf und nutzt die meisten der an der humanen Koagulation beteiligten Komponenten (Kamei *et al.*, 2006; Hanumanthaiah *et al.*, 2002; Weyand und Shavit, 2014). Sowohl die Koagulationsfaktoren als auch die an der Hämostase beteiligten Glykoproteine wie VWF von *D. rerio* weisen zudem eine hohe sequenzbasierte und strukturelle Ähnlichkeit zu den entsprechenden Faktoren beim Menschen auf (Hanumanthaiah *et al.*, 2002; Weyand und Shavit, 2014). Das Zebrafisch-Modell wird seit vielen Jahren zur Klärung von Fragestellungen zur Thrombogenese eingesetzt (Jagadeeswaran, 2005; Ghosh *et al.*, 2015; Weyand und Shavit, 2014).

Sowohl adulte Fische, als auch Larven wurden bereits sehr erfolgreich in verschiedenen bakteriellen Infektionsstudien zur Aufklärung der Streptokokkenpathogenese verwendet (Saralahti und Rämetsä, 2015; Saralahti *et al.*, 2014). Dazu zählen Infektionsstudien mit *S. dysgalactiae*, *S. equi subspec.*, *S. suis*, *S. iniae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes* und *S. pneumoniae* (Alves-Barroco *et al.*, 2018; Borst *et al.*, 2013; Zaccaria *et al.*, 2016; Membrebe *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2015; Patterson *et al.*, 2012; Phelps *et al.*, 2009; Rounioja *et al.*, 2012; Jim *et al.*, 2016). Ein weiterer Vorteil liegt in der Transparenz des Fischgewebes, die eine mikroskopische Visualisierung der Adhärenzvorgänge erleichtert und Echtzeit-Studien ermöglicht. Um die Auswirkungen der VWF-Rekrutierung auf die Endotheladhärenz in diesem *in vivo* System untersuchen zu können, wurden RFP-exprimierende Pneumokokken in die Herzkammer von 5-Tage alten, sedierten Zebrafisch-Larven injiziert. Bereits nach zwei-stündiger Zirkulation im Blutgefäßsystem des Zebrafisches konnte eine Rekrutierung von endogenem Zebrafisch-VWF

an die Pneumokokkenoberfläche detektiert werden. Zudem adhärten Pneumokokken in den Gefäßen im Bereich des Kiemenbogens über einen Zeitraum von bis zu 80 min trotz unverminderter Blutzirkulation. Wurden die Pneumokokken vor Injektion mit humanem VWF präinkubiert, so bildeten sich vor allem in Übergangsbereichen von unterschiedlich großen Gefäßen und Gefäßbögen Bakterien-Aggregate von bis zu 10 µm im Durchmesser, die an der Gefäßwand adhärten. An diesen Übergangsbereichen der Gefäßmündungen herrscht ein veränderter Blutstrom mit geringerer Geschwindigkeit vor, der nicht mehr laminar verläuft und zu lokalen Verwirbelungen führt. Diese Strömungsbedingungen begünstigen die bakterielle Adhärenz (Huppelsberg, J. & Walter, K. (vierte Auflage), Kurzlehrbuch Physiologie, Thieme). Durch die Aggregat-Bildung kann es vor allem im Mikrogefäßsystem schnell zu thrombotischen Gefäßverschlüssen kommen, die ein funktionelles Organversagen durch den Verlust der Gefäßfunktion zur Folge haben können. Neuere klinische Studien belegen, dass bis zu 30% aller Patienten, die eine ambulant erworbene Pneumonie durchleben, innerhalb von Monaten bis einigen Jahren nach der Infektion an lebensbedrohlichen kardiovaskulären Komplikationen erkranken (Restrepo und Reyes, 2018). Es ist anzumerken, dass grundsätzlich bei vielen bakteriell-bedingten Atemwegsinfekten ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung arterieller oder venöser Thrombosen festgestellt werden konnte (Mandal P, *et al.*, 2011 und Chen und Moe, 2012). Die wiederholt beobachteten VWF-vermittelten bakteriellen Aggregat-Bildungen in den Blutgefäßen des Zebrafisches stimmen mit den dargelegten Beobachtungen überein und daher könnte eine VWF-vermittelte Bakterien-Aggregat-Bildung auch mit den bei Pneumonie-Patienten vorkommenden kardiovaskulären Komplikationen in direktem Zusammenhang stehen. Pneumokokken treten als Auslöser infektiöser, subletaler-Endokarditiden in Erscheinung. Hierbei kommt es zu einer temporär erhöhten VWF-Konzentration und zur Ausbildung von bakteriellen Vegetationen, die sich am Endokarp der Herzklappe ansiedeln (Liesenborgh *et al.*, 2016). Ergänzend dazu wurden bei Patienten nach schweren Pneumokokken-Infektionen in den Arterien bakterielle Belege nachgewiesen. Durch eine massiv induzierte Entzündungsreaktion und eine vermehrte Koagulation bilden sich in Analogie zu den oben genannten Plaques bakterielle Belege aus, die letztlich eine Zerstörung des Herzklappengewebes zur Folge haben (Olmos *et al.*, 2014; Ishiekwe *et al.*, 2016). Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass ohne vorherige Stimulation der VWF-Sekretion eine Ansiedelung von *S. aureus* und *S. lugdunensis* in den Herzgefäßen nicht stattfindet, sondern nur im Zusammenhang einer großflächigen Endothelaktivierung (Liesenborgh *et al.*, 2016, Liesenborghs *et al.*, 9a. Microbial pathogenesis & virulence, 2017). Im Falle der eingesetzten

Injektionsmethode können jedoch keine Aussagen zu einer Endokarditis getroffen werden, da die Pneumokokken in das Herz injiziert wurden und somit hier eine Artefaktbildung durch den Injektionsvorgang vorhanden sein könnte. Um dieses Phänomen *in vivo* in dem eingesetzten Zebrafischmodell zu überprüfen, müsste nach mechanischer Verletzung der Herzklappen eine andere Injektionsstelle, z.B. die dorsale Aorta in der Schwanzregion der Zebrafisch-Larve genutzt werden.

Neben der VWF-vermittelten Aggregat-Bildung wurden in den vergangenen Jahren bereits weitere Mechanismen postuliert, die mit kardiovaskulären Komplikationen im Zuge einer Pneumokokkeninfektion in Zusammenhang gebracht wurden. Anhand eines Infektionsmodells in Primaten wurde nachgewiesen, dass Pneumokokken im systemischen Infektionsverlauf in das Herzmyokard einwandern und die Herzmuskelzellen durch apoptotische und nekroptotische Prozesse zerstören (Reyes *et al.*, 2017). Diese Studie knüpft an vorangegangene Ergebnisse von Brown und Mitarbeitern an, die Pneumokokken in Microläsionen des Herzmyokards nachgewiesen haben. Diese Microläsionen führen ebenfalls zum Absterben der Zellen und zur Schwächung der Herzkontraktibilität (Brown *et al.*, 2014). Ein weiterer postulierter Pathomechanismus basiert auf der zytotoxischen Aktivität des porenbildenden Pneumolysins, das zum Zelltod führt und mit einer für Herzschädigungen typischen Erhöhung der Troponin-Konzentrationen einhergeht (Alhamdi *et al.*, 2015; Shenoy *et al.*, 2017). Diese Ergebnisse korrelieren mit früheren Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, die zeigen, dass Pneumolysin bereits in geringen Konzentrationen die VWF-Sekretion stimuliert (Lüttge *et al.*, 2012). Allerdings wird in derselben Studie auch gezeigt, dass Pneumolysin-defiziente Pneumokokkenstämme durch ihre Endotheladhärenz ebenfalls eine VWF-Sekretion induzieren, sodass die zytotoxische Aktivität des Pneumolysins zwar die VWF-Konzentration effektiver erhöht, jedoch nicht zwingend dafür erforderlich ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen Beitrag zur Aufklärung der möglichen Pathomechanismen, die im Zusammenhang mit den beschriebenen kardiovaskulären Komplikationen stehen (Abbildung 5-3). Abschließend ist anzumerken, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur umfassenden biochemischen und funktionellen Charakterisierung eines neuen Adhäsionsmoleküls beigetragen haben und einen Grundstein für die Aufklärung eines medizinisch hoch-relevanten Pathomechanismus gelegt haben.

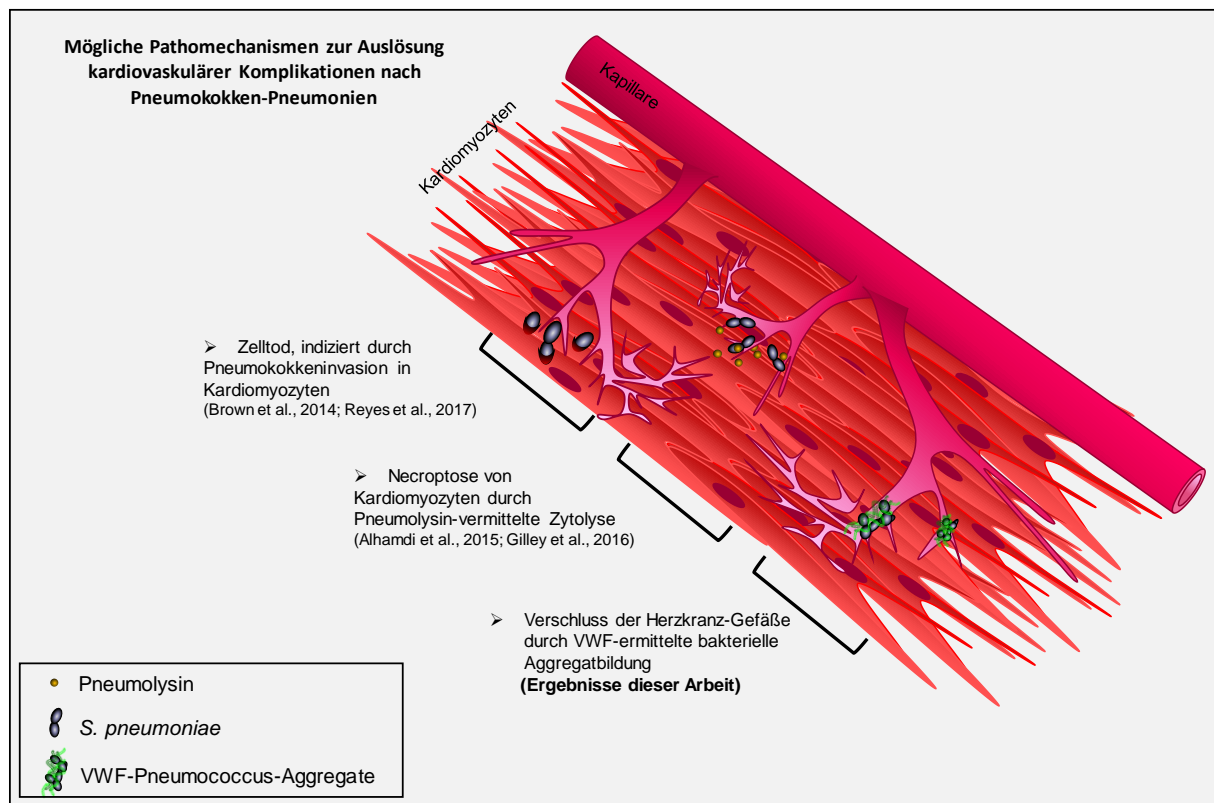


Abbildung 5-3: Schematische Darstellung der möglichen Pathomechanismen, die im Zusammenhang mit kardiovaskulären Komplikationen diskutiert werden

Das Schema stellt die mögliche Eingliederung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse als einen von drei postulierten Pathomechanismen der Pneumokokken-Interaktion mit Kardiomyozyten und Herzkranzgefäßen dar, die zu unterschiedlichen Schädigungen führen können.

6 Anhang

6.1. Photometrische Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl von *S. pneumoniae* und *E. coli* wurde durch photometrische Messung bestimmt. Für *S. pneumoniae* wurde die Absorption bei 600 nm gemessen. Bei einer optischen Dichte von beispielsweise $OD_{600} = 0,1$ wurde eine Zellzahl von $1 \cdot 10^8$ Z/mL angenommen. Diese Annahme stützt sich auf experimentelle Untersuchung des Zusammenhangs zwischen OD_{600} und Zellzahl. Es wurde ein linearer Zusammenhang für $OD_{600} < 1$ festgestellt. Der Zusammenhang kann auch mit folgender Formel beschrieben werden:

$$\text{Zellzahl} \left[\frac{\text{Z}}{\text{ml}} \right] = OD_{600} \cdot 10^9$$

Die Zellzahl für *E. coli* wurde auf ähnliche Weise bestimmt. Die optische Dichte wurde bei 550 nm gemessen. Hier besteht ebenso ein linearer Zusammenhang bei $OD_{550} < 1$. Mit folgender Formel wurde die Zellzahl berechnet:

$$\text{Zellzahl} \left[\frac{\text{Z}}{\text{ml}} \right] = (0,7305 \cdot OD_{550} + 0,0077) \cdot 10^9$$

6.2. In digitaler Form auf der CD hinterlegte Zeitreihenaufnahmen

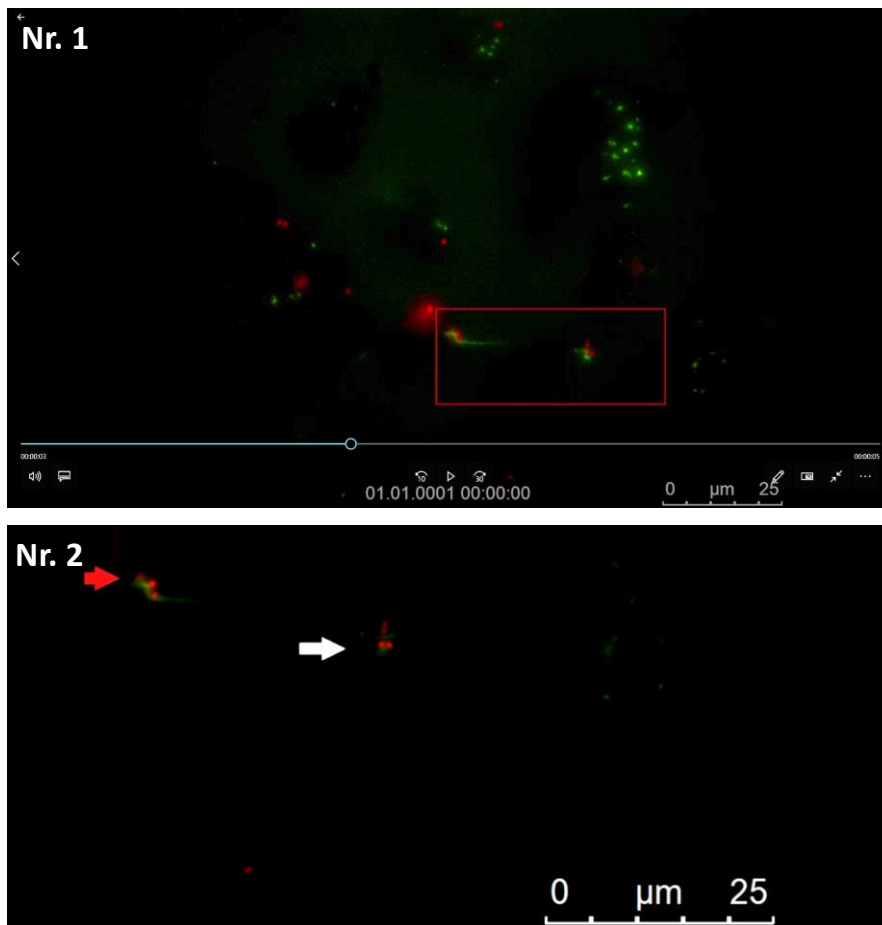


Abbildung 6-1: Zeitreihenaufnahme der Interaktion zwischen Pneumokokken und VWF-Fäden im Flusssystem.

In der Zeitreihenaufnahme (Nr.1) ist die Überlagerung des roten und grünen Fluoreszenz-Kanals während einer Infektion im Mikrofluidik-System nach Zugabe von Histamin gezeigt. Der globuläre und filamentöse VWF fluoresziert durch den FITC-konjugierten anti-VWF-Antikörper in Grün. Die RFP-exprimierenden Pneumokokken fluoreszieren rot. In der unteren Bildmitte ist innerhalb des roten Rechteckes für einen Zeitraum von 14 min eine stabile langzeit-Interaktion der Pneumokokken mit einem VWF-Faden von ca. 15 µm Länge zu erkennen. Innerhalb dieses Bildbereiches rechts neben den Pneumokokken am VWF-Faden sind ebenso Pneumokokken zu erkennen. Im Verlauf der Zeitreihenaufnahme ist an dieser Position ein VWF-Faden zu erkennen, der von den Pneumokokken gebunden wird. Eine Ausschnittsvergrößerung dieses Bereichs in dem sowohl die stabile Interaktion für 14 min dokumentiert wird, als auch die VWF-Faden-Sekretion ist in Zeitreihenaufnahme Nr.2 gezeigt. Für die Zeitreihenaufnahme wurden die Z-Stack Aufnahmen der Interaktion über 25 min für einen Zeitraum von 14 min in der Leica Software LasX über die Aktion „Process – Merge – in T (time)“ ausgewählt und anschließend zu einem Element zusammengefügt über den Zeitraum von 14 min mit der Aktion „Process – Projection – Maximum Projection“. Das Hinzufügen von Pfeilen und Rechtecken zur Verdeutlichung, sowie die Ausschnittsvergrößerung wurden mit der Software VEGAS Pro 16 vorgenommen. Die Frequenz der Zeitreihenaufnahme beträgt 1 Bild/2 min für die Dauer von 14 min. Der Maßstabsbalken umfasst eine Länge von 15 µm.

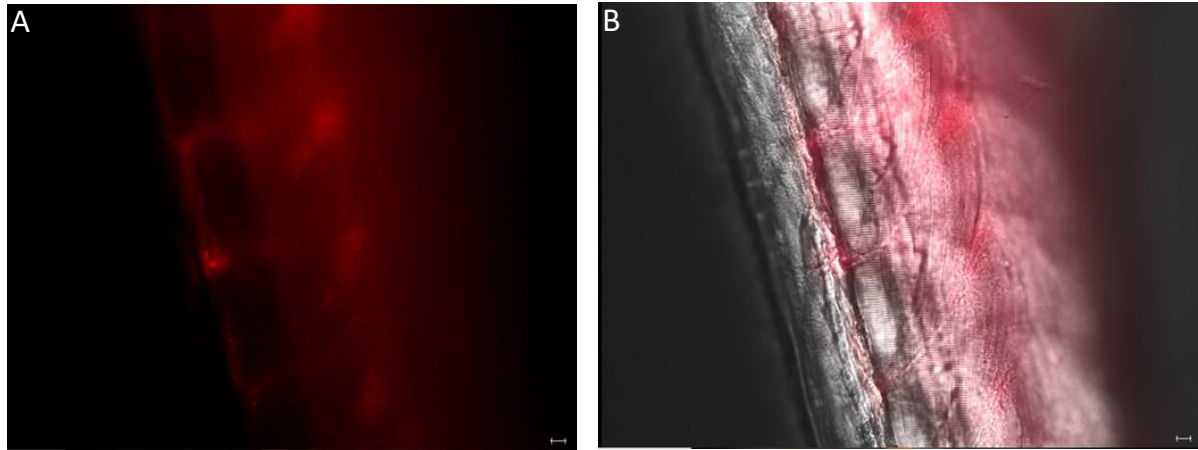


Abbildung 6-2: Zeitreihenaufnahme der Interaktion zwischen Pneumokokken und dem Zebrafisch-Endothel

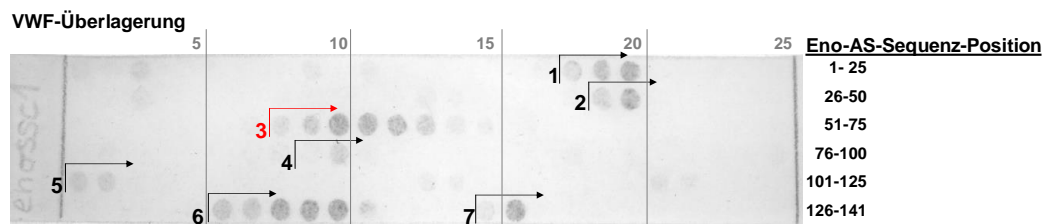
Dargestellt sind Ausschnitte aus den Zeitreihenaufnahmen. Die Zeitreihenaufnahmen zeigen adhärente, RFP-exprimierende Pneumokokken am Gefäßendothel einer Zebrafischlarve der transgene Fischlinie TgCflk1:mcherryCAAX am Tag 5 nach der Befruchtung. Die Zeitreihe visualisiert Pneumokokken, die in der Blutstrom-Zirkulation am Gefäßendothel haften bleiben. In der Zeitreihenaufnahmen Nr. 1 (A) sind Pneumokokken (PM40) in Rot an dem ebenfalls in Rot fluoreszierendem Gefäßendothel mit einem weißen Pfeil in der Teilabbildung hervorgehoben. Die Zeitreihenaufnahmen Nr. 2 (B) zeigt die Überlagerung von Hellfeld und roten Fluoreszenz-Kanal. In der Zeitreihenaufnahmen Nr. 3 ist der Blutfluss in Hellfeldbild dargestellt. Sämtliche Zeitreihenaufnahmen wurden mit Frequenz von 4 Bildern/min aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit dem 20-fach-Wasser-Objektiv und der Fluoreszenzbeleuchtung am Leica DMI8 aufgenommen und mit der Software LasX bearbeitet.

6.3. Daten aus der Biochemischen Charakterisierung der VWF-Eno Interaktion

;enosscl Peptide	- IEAAGYVPGKDVFLG
;15 mere	- AGYVPGKDVFLGFDG
.pep	- VPGKDVFLGFDGFCASS
MSIITDVYAREVLDS	- KDVFLGFDGFCASSEFY
ITDVYAREVLDSRGN	50 - FLGFDGFCASSEFYDKE
VYAREVLDSRGNPTL	- FDCASSEFYDKERKV
REVLDSRGNPTLEVE	- ASSEFYDKERKVYDY
5 LDSRGNPTLEVEVYT	- EFDYDKERKVYDYTKF
RGNPTLEVEVYTESG	- DKERKVYDYTKFEFE
PTLEVEVYTESGAFG	55 - RKVYDYTKFEFEGGAA
EVEVYTESGAFGRGM	- YDYTKFEFEGGAVRT
VYTESGAFGRGMVPS	- TKFEFEGGAVRTSAE
10 ESGAFGRGMVPSGAS	- EGEGAAVRTSAEQID
AFGRGMVPSGASTGE	- GAAVRTSAEQIDYLE
RGMVPSGASTGEHEA	60 - VRTSAEQIDYLEELV
VPSGASTGEHEAVEL	- SAEQIDYLEELVNKY
GASTGEHEAVELRDG	- QIDYLEELVNKYPII
45 TGEHEAVELRDGDKS	- YLEELVNKYPIITIE
HEAVELRDGDKSRYG	- ELVNKYPIITIEDGM
VELRDGDKSRYGGLG	65 - NKYPIITIEDGMDEN
RDGDKSRYGGLGTQK	- PIITIEDGMDENDWD
DKSRYGGLGTQKAVD	- TIEDGMDENDWDGKW
70 RYGGGLGTQKAVDNVN	- DGMDENDWDGKWALT
GLGTQKAVDNVNII	- DENDWDGKWALTERL
TQKAVDNVNIIAIA	70 - DWDGKWALTERLGKK
AVDNVNIIAIAIIG	- GWKALTERLGKKVQL
NVNIIAIAIIGYDV	- ALTERLGKKVQLVGD
75 NIIAIAIIGYDVRDQ	- ERLGKKVQLVGDDFF
AEAIIIGYDVRDQAI	- GKKVQLVGDDFFVTN
IIGYDVRDQQAIDRA	75 - VQLVGDDFFVTNTDY
YDVRDQQAIDRAMIA	- VGDDFFVTNTDYLAR
RDQQAIDRAMIALDG	- DFFVTNTDYLARGIQ
30 QAIDRAMIALDGTNP	- VTNTDYLARGIQEGA
DRAMIALDGTNPNGK	- TDYLARGIQEGAANS
MIALDGTNPNGKILGA	80 - LARGIQEGAANSILI
LDGTNPNGKILGANAI	- GIQEGAANSILIKVN
TPNGKILGANAILGV	- EGAANSILIKVNIQIG
35 KGKILGANAILGVSLA	- ANSILIKVNIQIGTLT
LGANAILGVSLAVAR	- ILIKVNIQIGTLTETF
NAILGVSLAVARAAA	85 - KVNQIGTLTETFEAI
LGVSIAVARAAADYL	- QIGTLTETFEAIEAMA
SIAVARAAADYLEIP	- TLTETFEAIEAMAKEA
40 VARAAADYLEIPLYS	- ETFEAIEAMAKEAGYT
AAADYLEIPLYSYLG	- EAIEAMAKEAGYTAVV
DYLEIPLYSYLGGFN	90 - EMAKEAGYTAVVSHR
EIPLYSYLGGFNTKV	- KEAGYTAVVSHRSGE
LYSYLGGFNTKVLPT	- GYTAVVSHRSGETED
45 YLGGFNTKVLPTPMM	- AVVSHRSGETEDSTI
GFNTKVLPTPMMNII	- SHRSGETEDSTIADI
TKVLPTPMMNIINGG	95 - SGETEDSTIADIAVA
LPTPMMNIINGGSHS	- TEDSTIADIAVATNA
PMMNIINGGSHSDAP	- STIADIAVATNAGQI
50 NIINGGSHSDAPIAF	- ADIAVATNAGQIKTG
NGGSHSDAPIAFQEF	- AVATNAGQIKTGSL
SHSDAPIAFQEFMIL	100 - TNAGQIKTGSLSRD
DAPIAFQEFMILPVG	- GQIKTGSLSRDRIA
IAFQEFMILPVGAPT	- KTGSLSRDRIAKYN
55 QEFMILPVGAPTKE	- SLSRDRDRIAKYNQLL
MILPVGAPTKEALR	- RTDRIAKYNQLLRIE
PVGAPTKEALRYGA	105 - RIAKYNQLLRIEDQL
APTKEALRYGAEIF	- KYNQLLRIEDQLGEV
FKEALRYGAEIFHAL	- QLLRIEDQLGEVAEY
60 ALRYGAEIFHALKKI	- RIEDQLGEVAEYRGL
YGAEIFHALKKILKS	- DQLGEVAEYRGLKSF
EIFHALKKILKSRGL	110 - GEVAEYRGLKSFYNL
HALKKILKSRGLETA	- VAERYGLKSFYNLKK
70 KKILKSRGLETAAGD	0
115 LKSRGLETAAGDEGG	0
RGLETAAGDEGGFAP	0
ETAVGDEGGFAPRFE	0
VGDEGGFAPRFEFGE	0
EGGFAPRFEFGEDEV	0
120 FAPRFEFGEDEVETI	0
RFEGTEDEVETILAA	0
GTEDEVETILAAIRA	0
DGVETILAAIRAAGY	0
ETILAAIRAAGYVPG	0
125 LAAIRAAGYVPGKDV	0

Abbildung 6-3: Enolase-Peptid-Membran

Dargestellt sind alle 141 Synthetischen-Peptide, die die Sequenzen der Pneumokokken Eno des Stammes D39 umfassen. Die Spots setzten sich aus 15 AS zusammen, die in 12 AS überlappen. Die Membran wurde hergestellt von der Forschungsgruppe Peptidsynthese von Dr. Werner Tegge am HZI Braunschweig.



Putative VWF-Bindungs Peptide der Enolase:

Nr. 1: 52RDGDKSRYGGLGTQK ⁶⁶ 55DKSRYGGLGTQKAVD ⁶⁹ 58RYGGLGTQKAVDNNV ⁷²	Nr. 4: 249DKERKVYDYTKFEGE ²⁶¹ 252RKVYDYTKFEGEGAA ²⁶⁴
Nr. 2: 144LYSYLGGFNTKVLPT ¹⁵⁹ 147YLGGFNTKVLPTPMM ¹⁶²	Nr. 5: 300GWKALTERLGKKVQL ³¹⁵ 303ALTERLGKKVQLVGD ³¹⁸
Nr. 3: 189FKEALRYGAEIFHAL ²⁰⁴ 192ALRYGAEIFHALKK ²⁰⁷ 195YGAEIFHALKKILKS ²¹⁰ 197EIFHALKKILKSRL ²¹³ 200HALKKILKSRLGLET ²¹⁶ 203KILKSRLGLETAVGD ²¹⁹	Nr. 6: 390GQIKTGSLSRDRIA ⁴⁰⁵ 393KTGSLSRDRIA ⁴⁰⁸ 396SLSRDRIA ⁴¹¹ 399RTDRIA ⁴¹⁴ 402RIA ⁴¹⁷
	Nr. 7: 418GEVVAEYRGLKSFYN ⁴³² 421VAEYRGLKSFYNLKK ⁴³⁵

Abbildung 6-4: Abbildung 6-5: Abbildung 6 2: VWF-Überlagerungsmembran mit den sieben putativen VWF-Bindungs-Motifen

Zu sehen ist die mit VWF-überlagerte Eno-Peptid-Membran. Die Membran wurde mit 20 µg VWF (Merck) ü.N. inkubiert und anschließend mit dem anti-VWF-Antikörper und einem gegen Maus gerichteten, mit einer AP-gekoppelten Sekundärantikörper entwickelt. Die Detektion von gebundenen Sekundär-Antikörper erfolgte über die gekoppelte AP und H₂O₂ als Substrat sowie Chloronaphthol (1-StepTM Chloronaphtho, Pierce) als ausfallender Farbstoff, der umgesetzt wird. Auf der Membran sind mit den Zahlen von 1 bis 7 die Protein-Spots zu Motife zusammengefasst. Die AS Zusammensetzung der Motife 1 bis 7 ist unter der Membran mit den Nummern Nr. 1 bis 7 aufgeführt. Das zentrale Interaktionspeptid des Motif Nr.3 ist in Rot dargestellt. Es befindet sich in der Sequenz der Peptid-Spot-Membran der Pneumokokken-Eno auf der AS-Position 195-210 der Peptide auf er Membran. Das Motif Nr. 1 befindet sich auf der Position 52-72, das Motif Nr. 2 bei 144-162, Motif Nr. 3 bei 189-219, Motif Nr. 4 bei 249-264, Motif Nr. 5 bei 300-318, Motif Nr. 6 bei 390-417 und Motif Nr. 7 bei 418-435.

Tabelle 6-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Spotmembran

Spalte drei und vier zeigen die Werte der relativen Pixel-Intensitäten (PI) der Auswertung durch ImageJ. Es wurden 0,5 µg und 0,05µg Enoalse verwendet. Die übrigen proteine wurden in Mengen von 1 µg und 0,1 µg immobilisiert. Tabelle aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

Oberflächenprotein	Interaktion mit vWF	1 µg Spot [PI]	0,1 µg Spot [PI]	vWF-AK-Kontrolle
AliB	ja	23.227	5.104	negativ
DacB	nein	0	0	negativ
PpmA	ja	14.226	290	negativ
SlrA	ja	22.759	10.802	negativ
SP_0191	ja	39.094	19.165	negativ
SP_0899	ja	72.784	3.987	negativ
PfbA	ja	64.373	25.027	negativ
PnrA	ja	20.279	1.213	negativ
SP_1992	ja	47.875	23.500	negativ
SP_2063	ja	28.948	15.158	negativ
SP_1069	ja	22.461	15.779	negativ
SP_1326	ja	180.943	65.152	negativ
PspA	ja	4.290	0	negativ
PspC/SH13	ja	99.950	20.572	negativ
PspC/SH2	ja	20.978	15.375	negativ
Hic2	ja	30.161	34.578	negativ
PavB/SSURE 2+3	ja	32.452	42.699	negativ
PccL	nein	0	0	negativ
PccL_70-152 aa	ja	7.895	1.138	negativ
α-Enolase 0,5 µg	ja	36.180	4.936	negativ
α-Enolase 1 µg	ja	142.807	-	negativ
vWF	-	191.821	60.357	positiv

6.4. Daten aus der Analyse der Bindungskinetik zwischen Eno und VWF-Monomer der MST

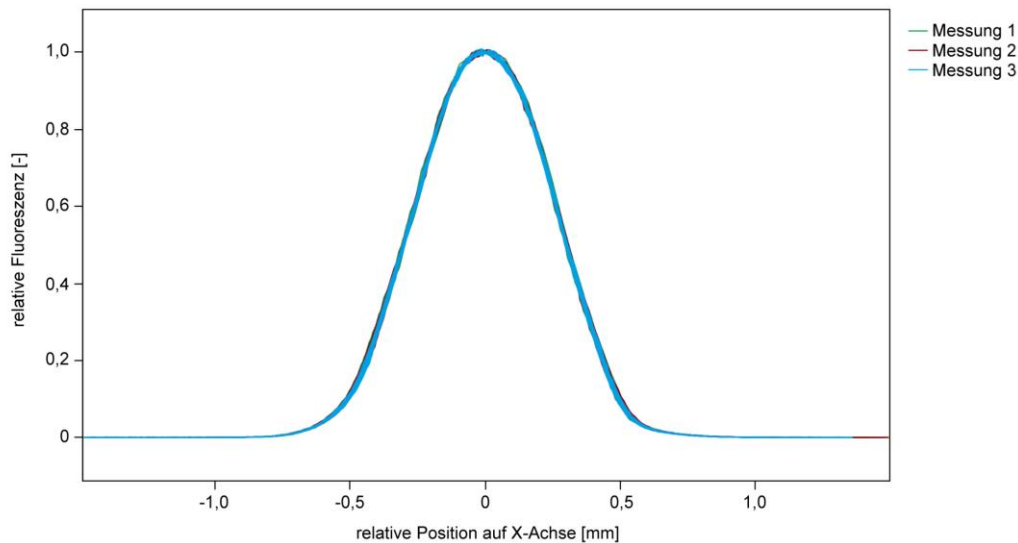


Abbildung 6-6: Signalspitzenform der Bindungsmessungen von Enolase und VWF-Monomeren

Die Form der Signalspitzen aller Bindungsmessungen ist übereinandergelegt. Die Kurven haben eine gleichmäßige Verteilung. Es kam zu keiner unerwünschten Wechselwirkung der Proben mit den Kapillaren. Abbildung aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

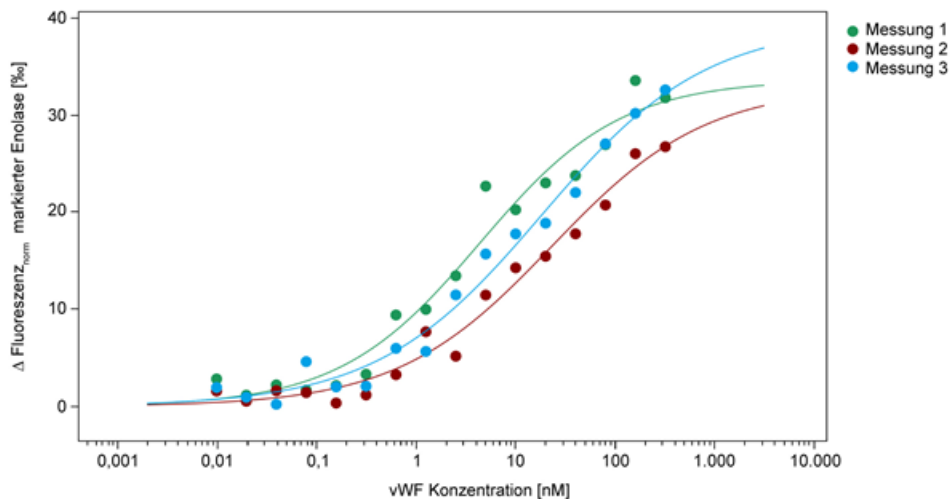


Abbildung 6-7: Einzelne Bindungskurven der drei Bindungsmessungen zur Eno-VWF-Interaktion

Die Differenz der normalisierten Fluoreszenz der markierten Enolase ist über die VWF-Monomer-Konzentration aufgetragen. Die Bindungskurven der drei Messungen von VWF und Enolase sind farblich markiert als Punkte dargestellt. Eine Regressionskurve nach der Hill-Fit-Methode ist für jede Kurve als durchgezogene Linie dargestellt. Abbildung aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

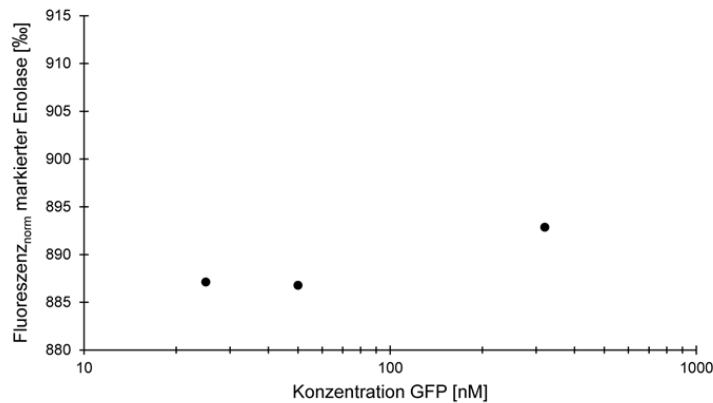


Abbildung 6-8: MST-Kontrollmessung zur Interaktion von GFP und Enolase

GFP wurde in verschiedenen Konzentrationen zu fluoreszenzmarkierter Enolase gegeben. Anschließend wurde die MST-Bindungsmessung bei 40 % LED Leistung und 40 % MST Leistung in Standardkapillaren durchgeführt. Die normalisierte Fluoreszenz der markierten Enolase weist über den Konzentrationsverlauf des GFP keine Änderung auf, die als Bindungskurve interpretiert werden kann. Abbildung aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

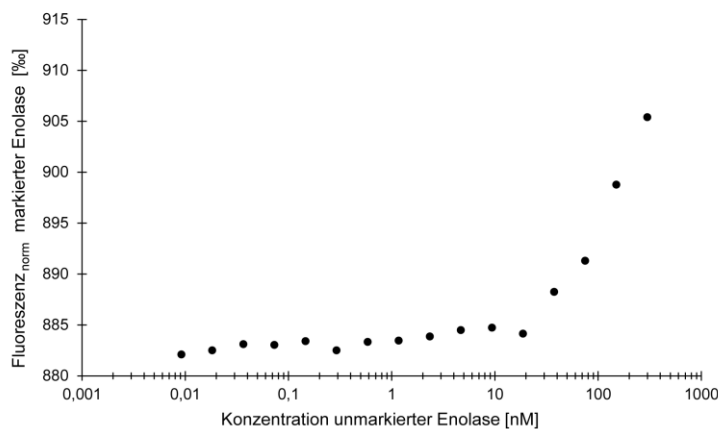


Abbildung 6-9: MST-Messung zur Multimerisierungsaktivität der Enolase

Bindungsdaten zur Interaktion zwischen Fluoreszenz-markierter Enolase und nicht-markierter Enolase. Die markierte Enolase wurden mit 25 nM eingesetzt und das nicht markierte Protein in Konzentration von 0,0091 nM bis 300 nM hinzu titriert. Die Konzentration der nicht markierten Enolase ist auf der Abszisse aufgetragen, die normalisierte Fluoreszenz der markierten Enolase auf der Ordinate. Die MST-Messung erfolgte bei 40 % LED-Leistung und 40 % MST-Leistung in Standardkapillaren. Abbildung aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

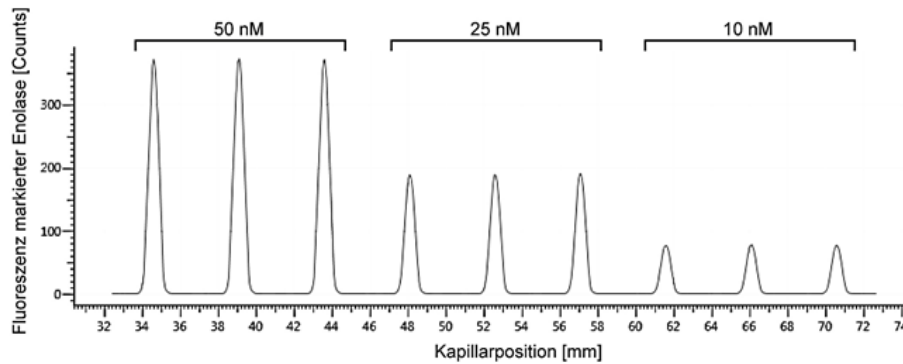


Abbildung 6-10: Messergebnisse zur Feststellung der Markierungseffizienz der Pneumokokken-Enolase

Das Diagramm bildet die Fluoreszenzintensität von drei verschiedenen Konzentrationen der Enolase ab. Die drei Signalspitzen ganz links repräsentieren Triplikate der Messungen mit 50 nM Enolase. Die drei mittleren Signalspitzen entsprechen einer Enolasekonzentration von 25 nM und die letzten drei stellen 10 nM Enolase dar. Der sogenannte Cap Scan wurde bei 20 % LED Leistung mit dem Rot-Detektor durchgeführt. Die Messung erfolgte in Standardkapillaren. Abbildung aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

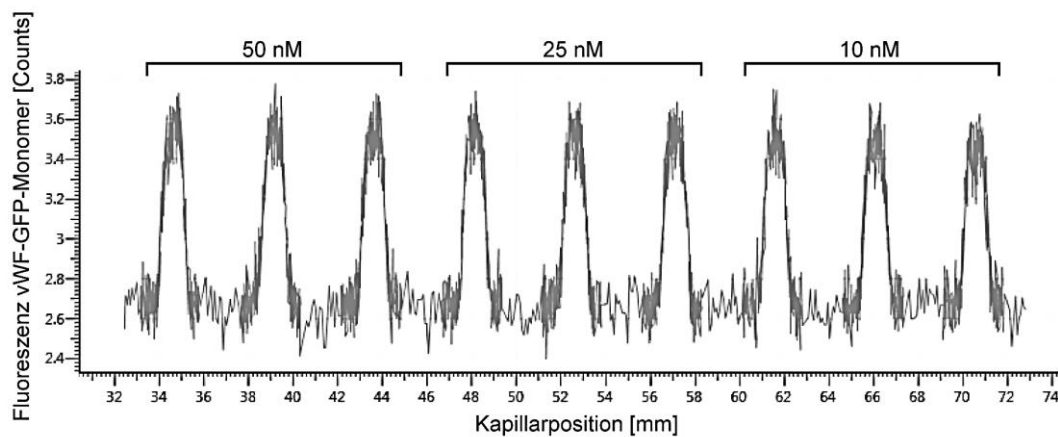
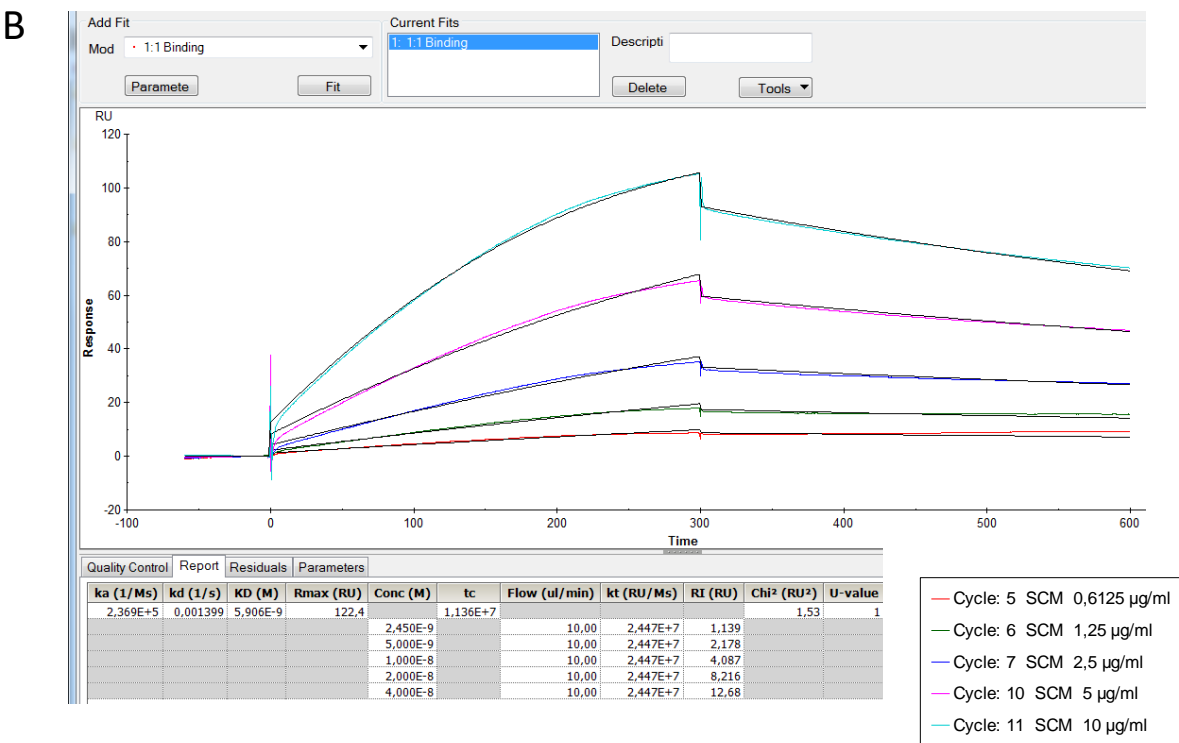
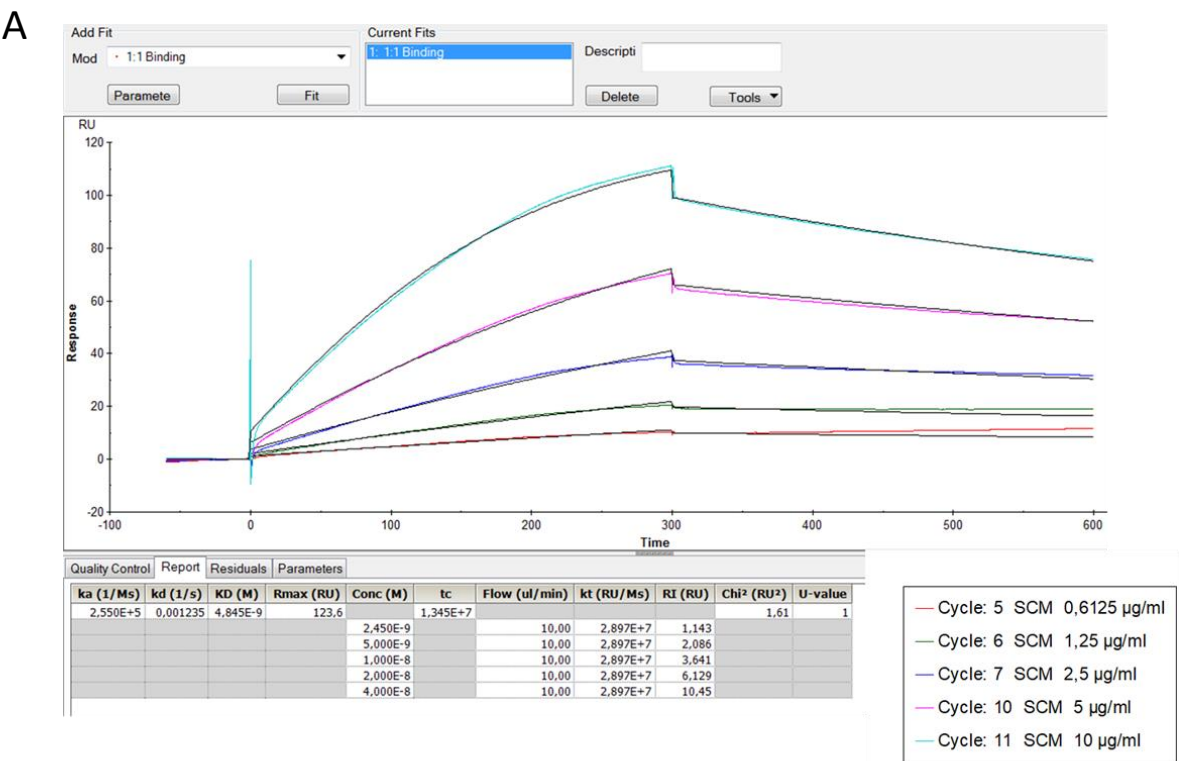


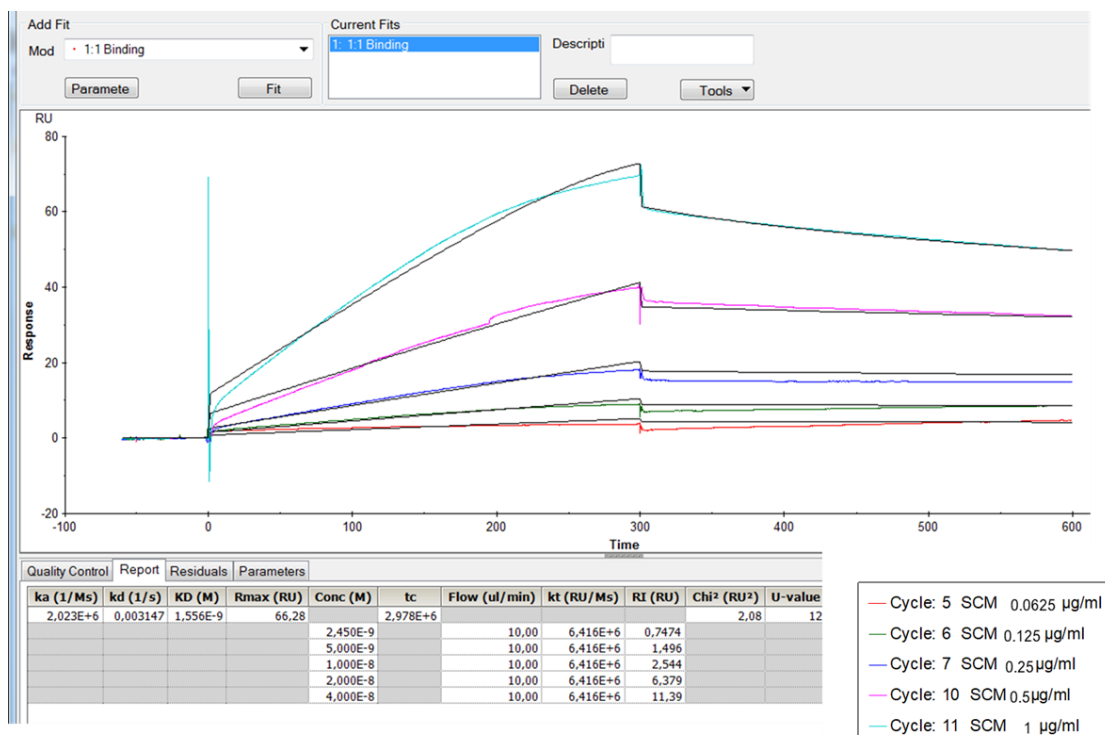
Abbildung 6-11: Fluoreszenzintensität des eGFP-Tag vom VWF-Monomer im Rot-Detektor

Die Abbildung zeigt Fluoreszenz-Signalspitzen der Messung von unterschiedlichen VWF Konzentrationen (100 nM, 50 nM und 25 nM) bei 40 % LED Leistung, in Standardkapillaren und Aufnahme durch den Rot-Detektor. Abbildung aus der Masterarbeit von Valentina Elspaß, 2017.

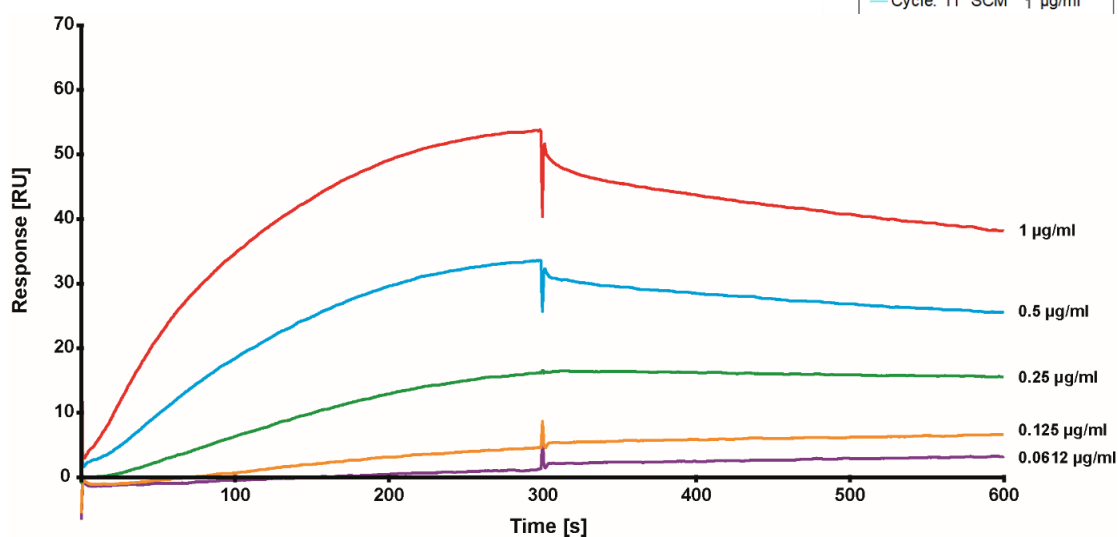
6.5. Daten aus der Analyse der Bindungskinetik zwischen Eno und VWF-Monomer der SPR



C



D



E

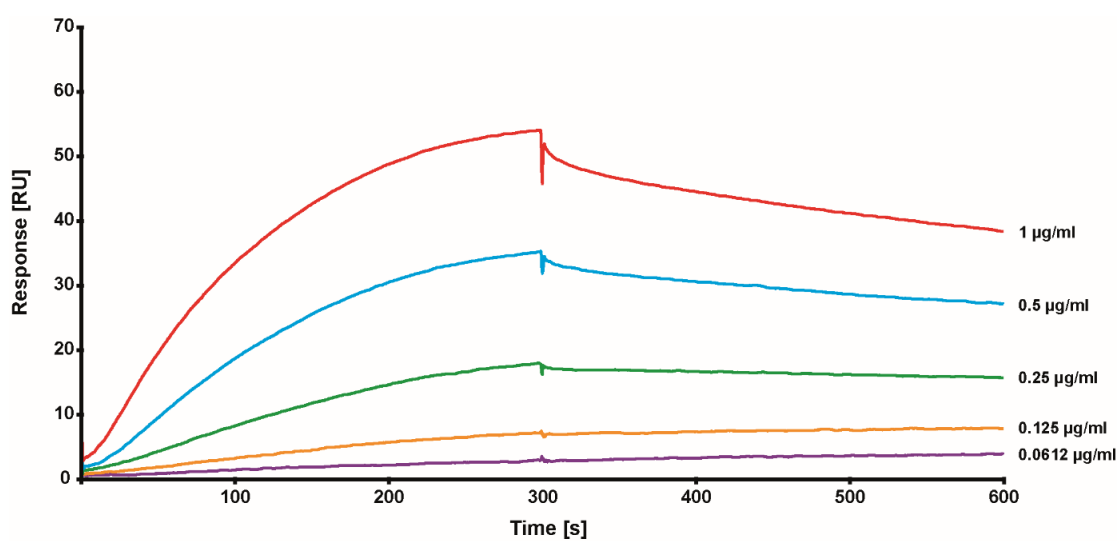


Abbildung 6-12: Rohdaten der Biacore-Sensogramme für die Eno-VWF- und Eno-A1-Domänen-Interaktionsmessung

Dargestellt sind in (A) und (B) zwei unabhängig voneinander erstellten Sensogramme in A und B der Bindungsresonanz von 0,6125 bis 10 µg/mL VWF an immobilisierte Eno. Das durchgeführte sogenannte „Fitting“ der Sensorgramme erfolgte anhand Farbzuzuweisung in der Legende. In (C), (D) und (E) sind die drei unabhängig voneinander erstellten Sensogramme von 0,0612 bis 1 µg/mL der VWF-A1-Domäne an immobilisierte Eno dargestellt. Das durchgeführte Anpassen der aufgenommenen Sensorgramme ist repräsentativ für das Sensogram (C) in der Tabelle am rechten Rand zu den Konzentrationen zugewiesene Farben erfolgt. Unterhalb des aufgenommenen Sensogramms in (C) befindet sich die Tabelle mit den Rohdaten. Die Tabelle enthält die gemittelten K_d-Werte (K_D), die max. Response Unit (RU), die Hintergrund-Resonanz (RU), sowie die Chi²-Werte zur Einschätzung der Fit-Genauigkeit. Die Messungen wurden von Dr. Thomas Kohler, Universität Greifswald durchgeführt.

6.6. Repräsentative Flussinfektions-Übersichtsaufnahmen bei den verschiedenen Versuchvarianten

In den Nachfolgenden Abbildungen sind für die Flussversuche repräsentative Bildausschnitte für den Zeitraum 30 min und bis 90 min dargestellt. Die Abbildung zeigen jeweils den Einzelkanal der grünen Fluoreszenz zur VWF-Detektion (VWF), den Einzelkanal der roten Fluoreszenz zur Visualisierung der RFP-exprimierenden Pneumokokken (RFP-Pneumo), sowie das Hellfeld-Bild (HF) und die Überlagerung aller Kanäle (ÜL). Die Teilabbildungen (A) repräsentieren den Zeitraum während der ersten 30 min der Flusskultur-Infektion, die in (B) den Zeitraum von 61 – 90 min. Dabei sind einige VWF-Fäden mit einem gelben Pfeil markiert, während die weißen Pfeile auf einige globuläre VWF-Moleküle hinweisen. Die roten Pfeile weisen auf Pneumokokken hin, die im roten Fluoreszenz-Kanal zu erkennen sind in den Ansätzen mit und ohne Histamin. Im Hellfeld (HF) ist die Endothelzellschicht zu erkennen. Sämtliche Aufnahmen wurden mit einem 63-fachen Öl-Immersions-Objektiv mit einer Fluoreszenzbeleuchtung am Leica DMI8 aufgenommen und mit der Software LasX bearbeitet. Die Aufnahmen wurden nach Zugabe von 83 ng/ml Histamin während eines konstanten Scherstress von 10 dyn/cm² durchgeführt. Der Maßstabsbalken am unteren rechten Rand jeder Aufnahme entspricht 10 µm.

PM 40 Hitzeinaktivierung

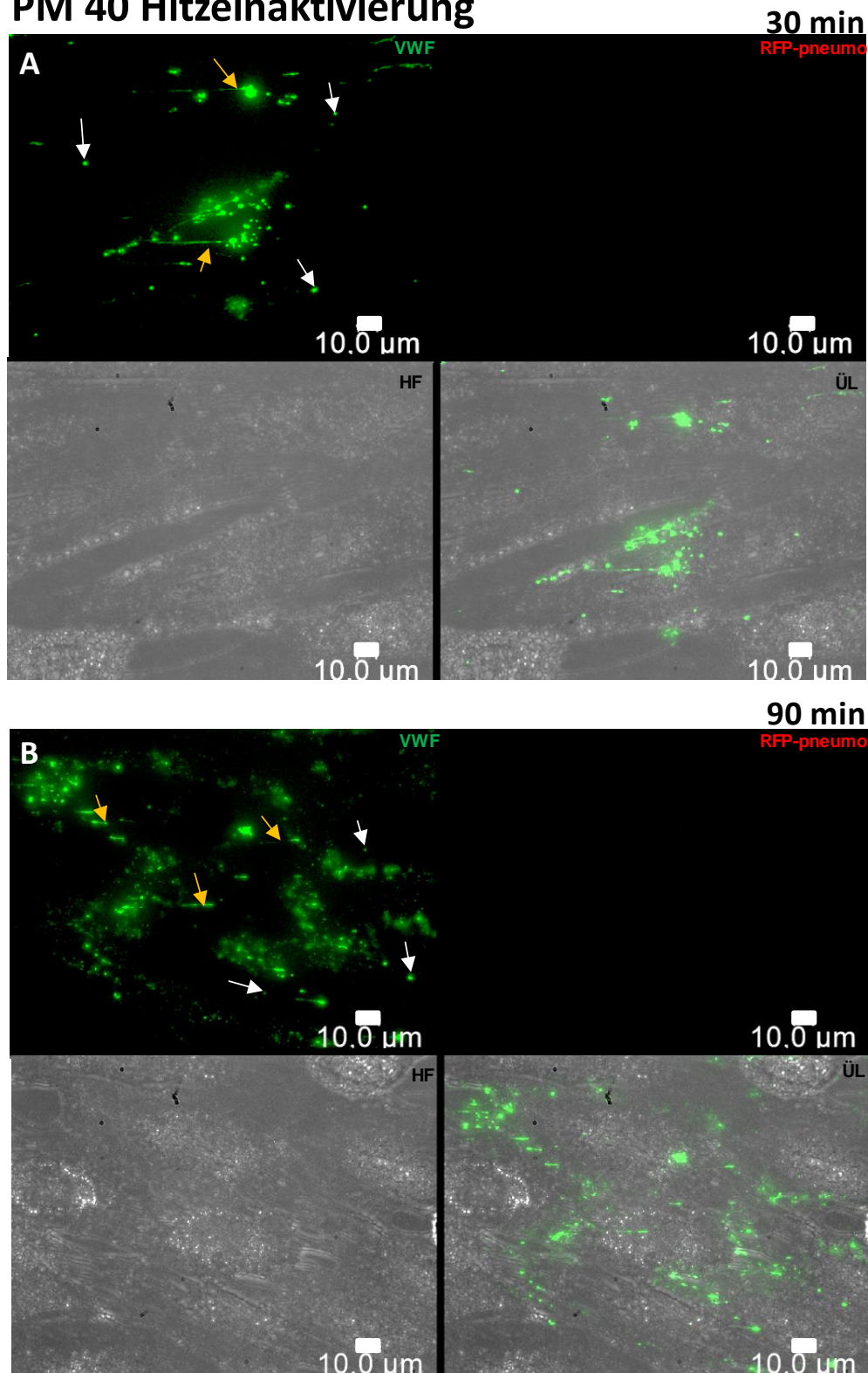


Abbildung 6-13: Fluoreszenzvisualisierung der Flusskultivierung mit hitzeinaktiveiren PM40 Bakterien bei Histaminzugabe für 30 min (A) und 90 min (B)

Die Darstellung der roten Fluoreszenz (RFP-Pneumo) belegt, dass weder an den HUVECs noch an VWF-Fäden hitzeinaktivierte Pneumokokken detektiert wurden. Im Hellfeld (HF) ist die Endothelzellschicht zu erkennen. Dabei sind einige VWF-Fäden mit einem gelben Pfeil markiert, während die weißen Pfeile auf globuläre VWF-Moleküle hinweisen. Es konnte das Auftreten beider Konformationen beobachtet werden.

PM 40 mit Histamin

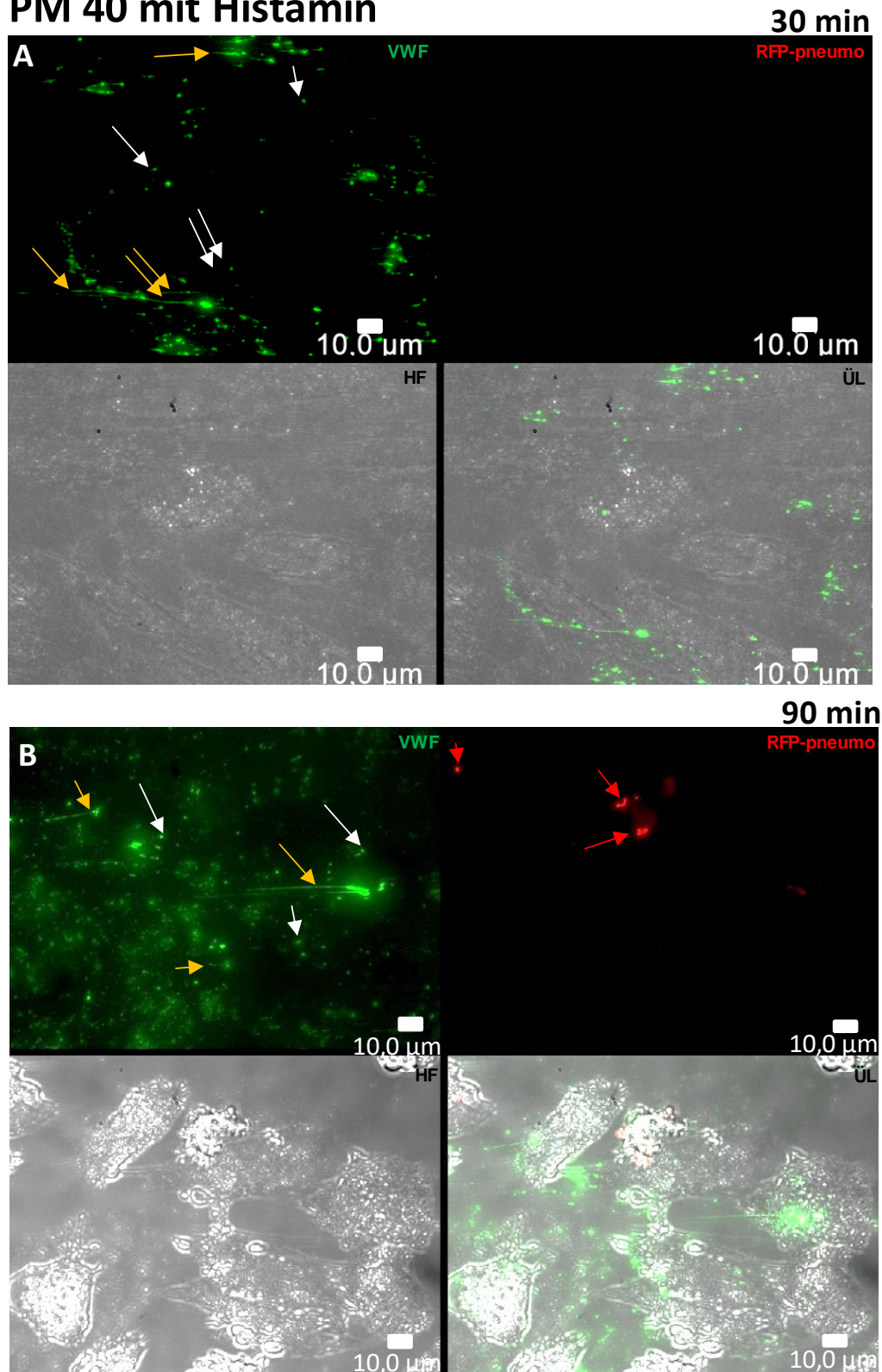


Abbildung 6-14: Fluoreszenzvisualisierung der Flusskultivierung mit Pneumokokken (PM40) bei Histaminzugabe für 30 min (A) und 90 min (B)

Die Detektion der roten Fluoreszenz zeigt nach einer Flussinfektion von 31-90 min RFP-exprimierende Pneumokokken, die an HUVECs adhären (rote Pfeile). Im Hellfeld (HF) ist die Endothelzellschicht zu erkennen. Bedingt durch die Infektion und dem zusätzlich vorhandenen Scherstress von 10 dyn/cm² weist die Morphologie der HUVEC Infektionsstress-bedingte Zellschädigungen auf.

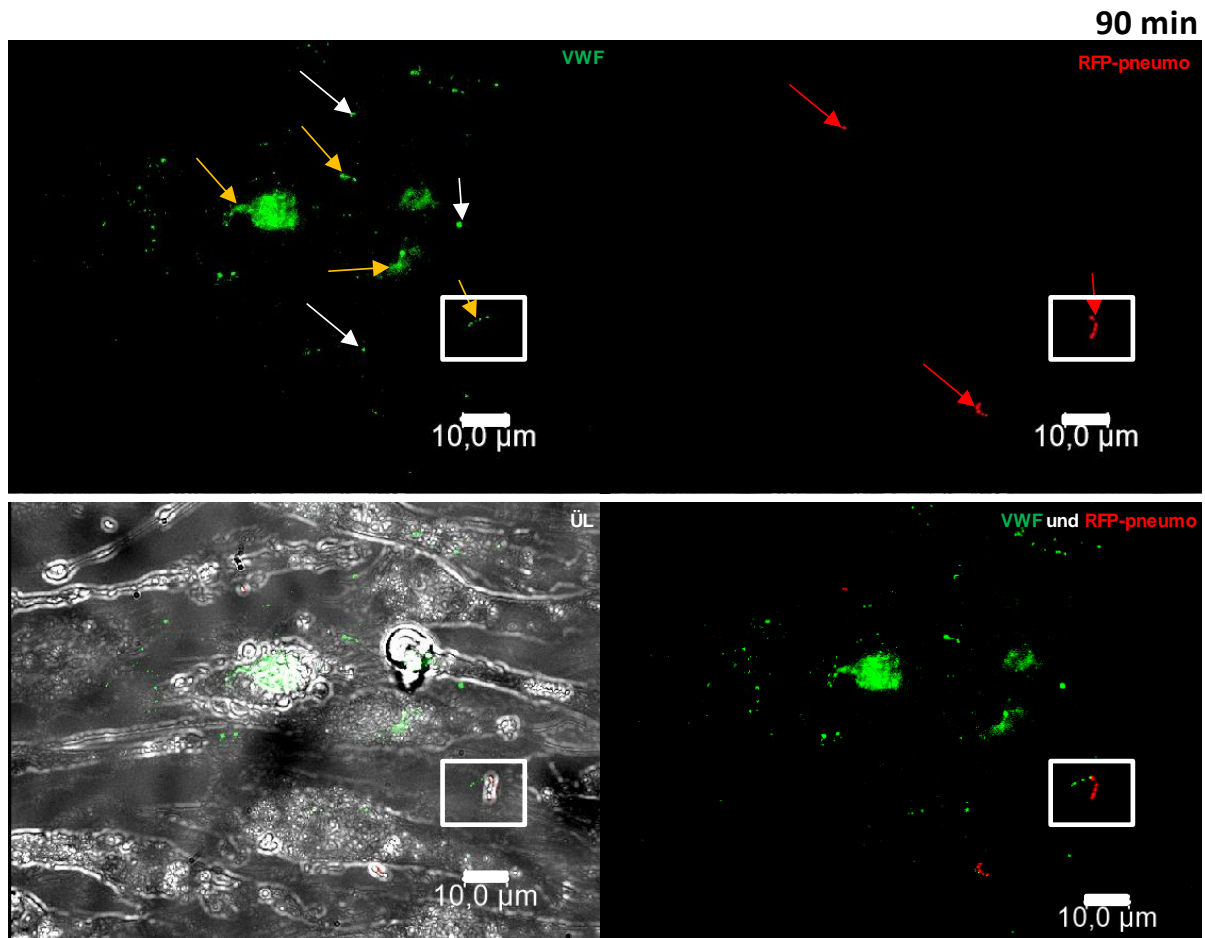


Abbildung 6-15: Fluoreszenzvisualisierung der Flusskultivierung mit Pneumokokken (PM40) ohne Histaminzugabe für 90 min

Im Kanal der roten Fluoreszenz (RFP-Pneumo) sind in der Aufnahme im Zeitraum von 31-90 min Pneumokokken zu erkennen (rote Pfeile), die an HUVECs adhären vorliegen. Ohne Induktion durch Histamin sind von 61-90 min sowohl filamentöser VWF (gelbe Pfeile), als auch globulärer VWF (weiße Pfeile) im grünen Fluoreszenz-Kanal zu erkennen. Durch den weißen Kasten in sämtlichen Kanälen ist der Bildausschnitt hervorgehoben, in dem eine Pneumokokken-Kette an einen VWF-Faden gebunden vorliegt. Im Hellfeld (HF) ist die Endothelzellschicht zu erkennen. Bedingt durch die Infektion und den zusätzlich vorhandenen Scherstress von 10 dyn/cm² ist die HUVEC-Zellschicht in dem Zeitraum von 31-90 min Zellstress-bedingt geschädigt. Aufnahmen wurden während eines konstanten Scherstress von 10 dyn/cm² durchgeführt ohne Einsatz von Histamin zur VWF-Sekretion. Der Maßstabsbalken am unteren rechten Rand jeder Aufnahme entspricht 10 µm.

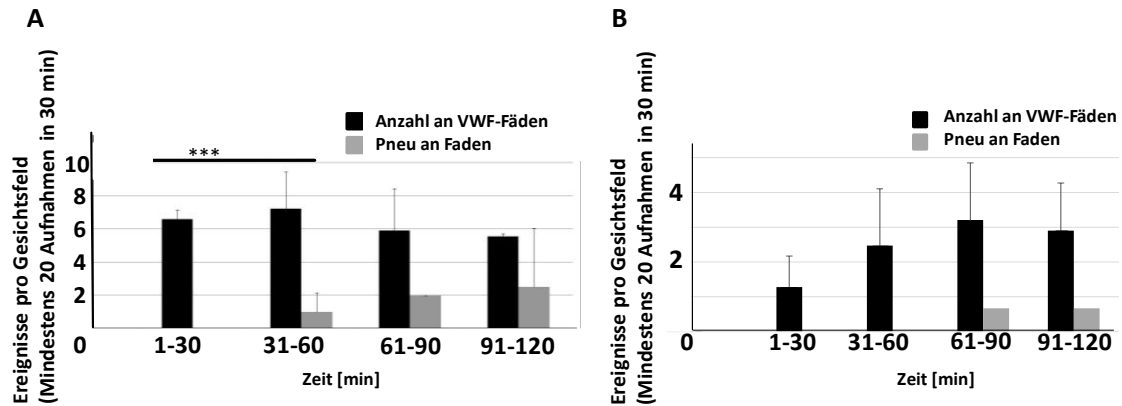
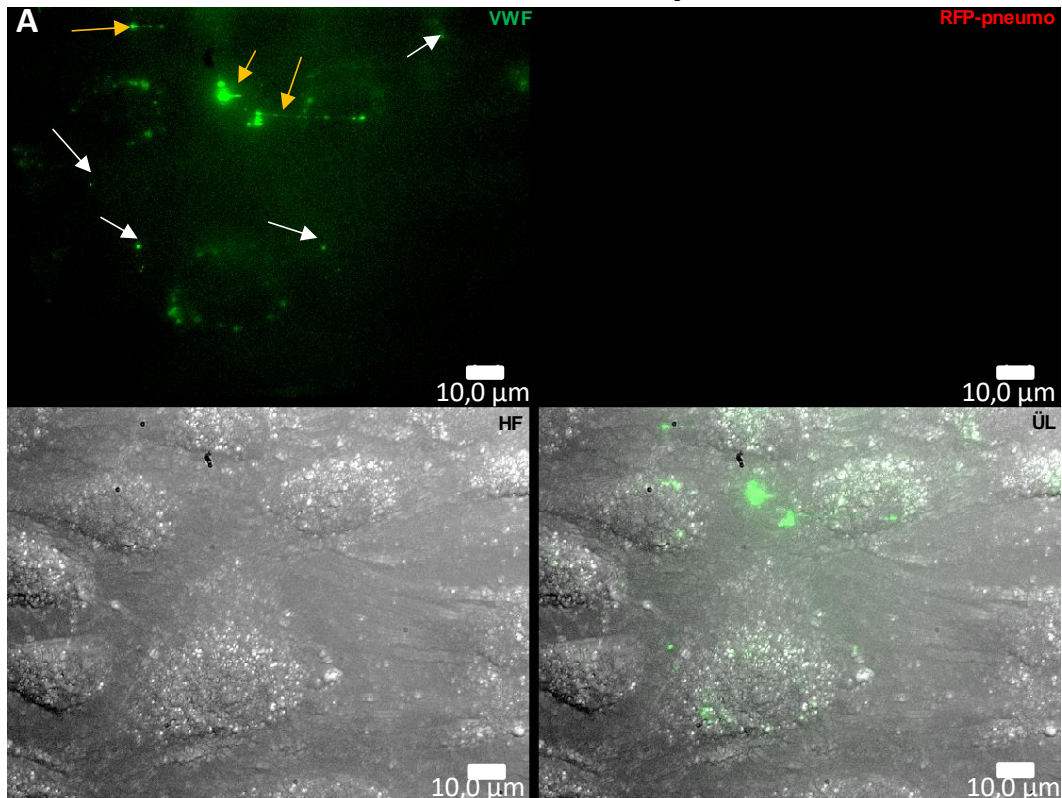


Abbildung 6-16: Vergleich der Fadenanzahl und der an VWF-Fäden adhärrierender Bakterien mit und ohne Histamin in der Flusskultivierung

In (A) und (B) sind die Anzahl an beobachteten VWF-Fäden und an Pneumokokken, die an VWF-Fäden gebunden waren dargestellt. Die dabei sind die gezählten Objekte zu den Zeitpunkten 0 min, 1-30 min, 31-60 min, 61-90 min und 91-120 min ermittelt. In (A) wurden 1 mM Histamin/mL zu der Infektion geben. Die ermittelte Signifikanz vom Zeitwert 31-60 min hat einen P-Wert von $< 0,05$ verglichen zum Zeitwert 1-30 min. In (B) wurde kein Histamin zur Stimulation der VWF-Sekretion eingesetzt. Bei den adhärenen Pneumokokken an den VWF-Fäden (Pneu an VWF-Fäden) handelt es sich um die einzeln aufsummierten gesamten Ereignisse pro Zeiteinheit. Dabei wurde als ein Adhärenz-Ereignis erfasst, wenn eine oder mehrere Pneumokokken an einen VWF-Faden gebunden waren. Es wurden mindestens alle 30 min 20 Z-Stack angefertigt für die Auszählung und Pro Bildausschnitt über die Versuche eine Anzahl von 12-13 HUVECs/Bildausschnitt ausgezählt. Die Daten setzten sich aus drei voneinander unabhängigen Versuchen und den Standardabweichungen der beobachteten Objekte zusammen.

PM 40 mit Histamin und 30 IU Heparin

30 min



90 min

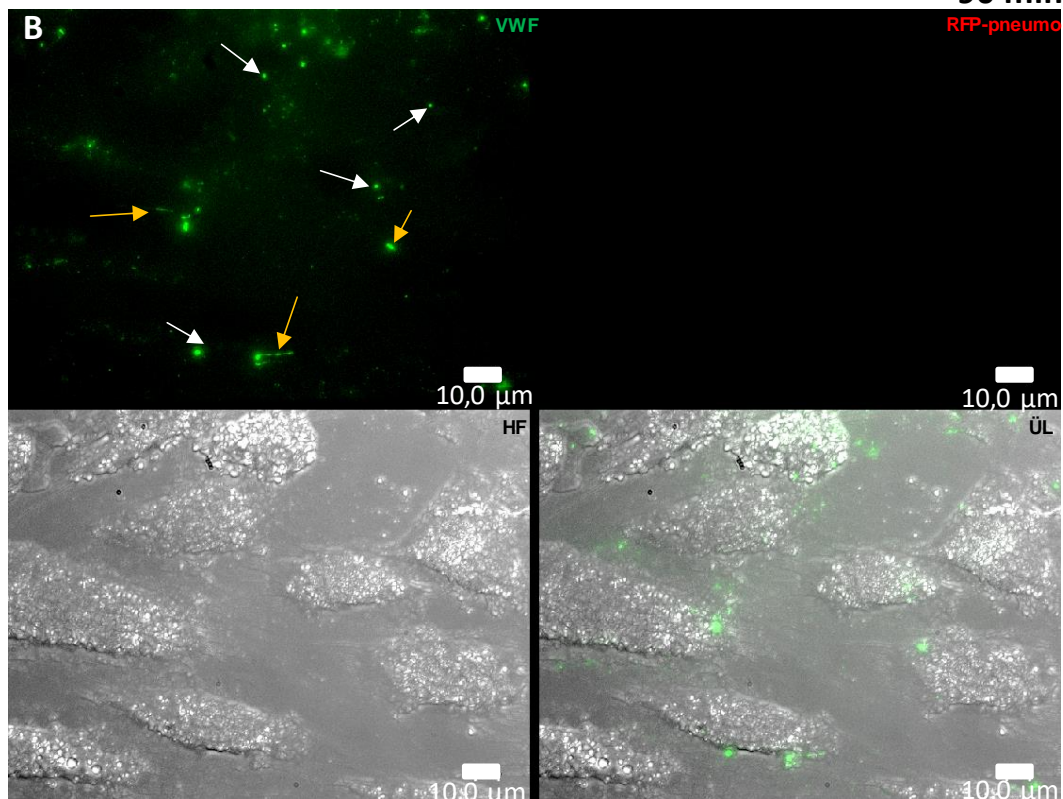
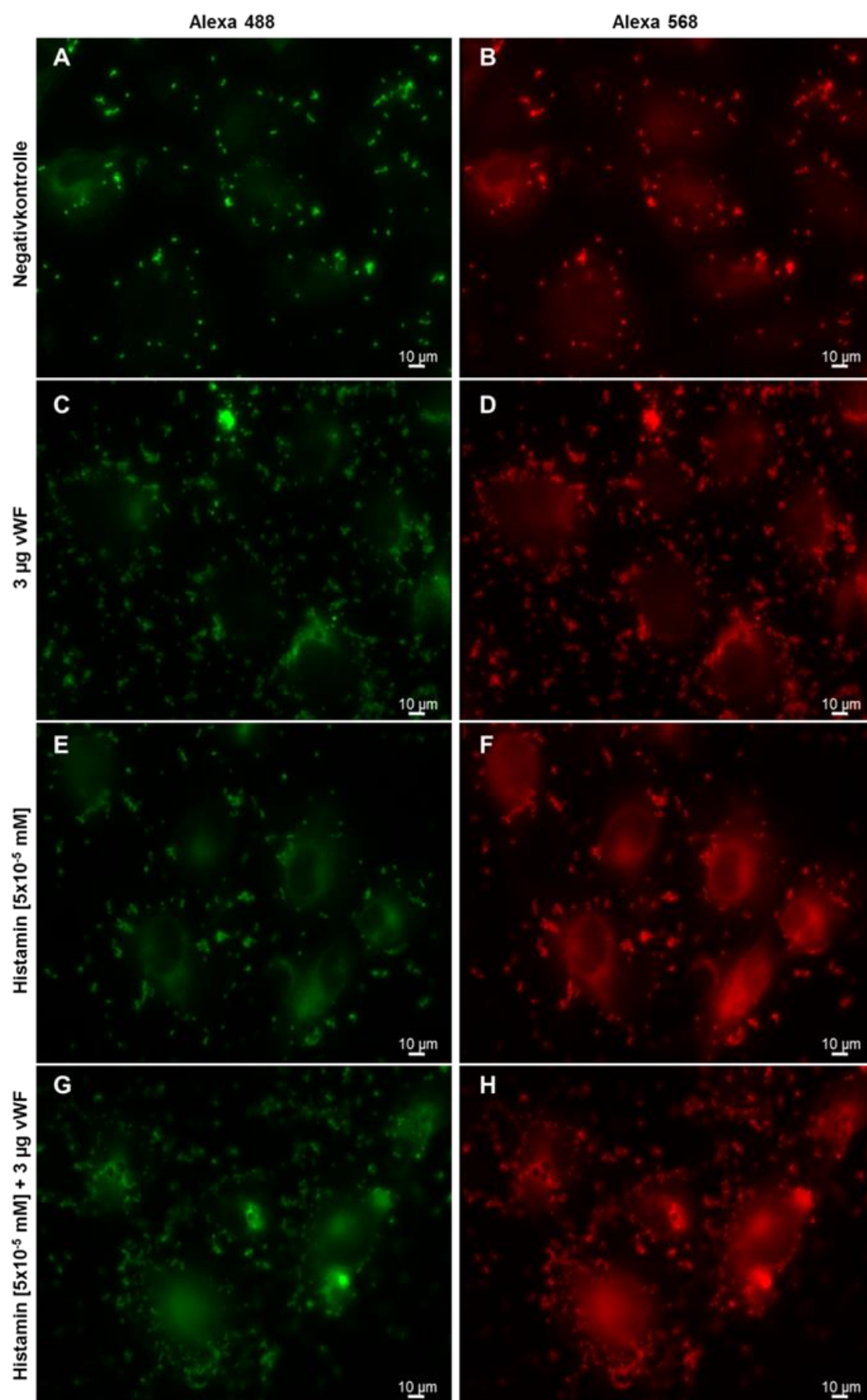


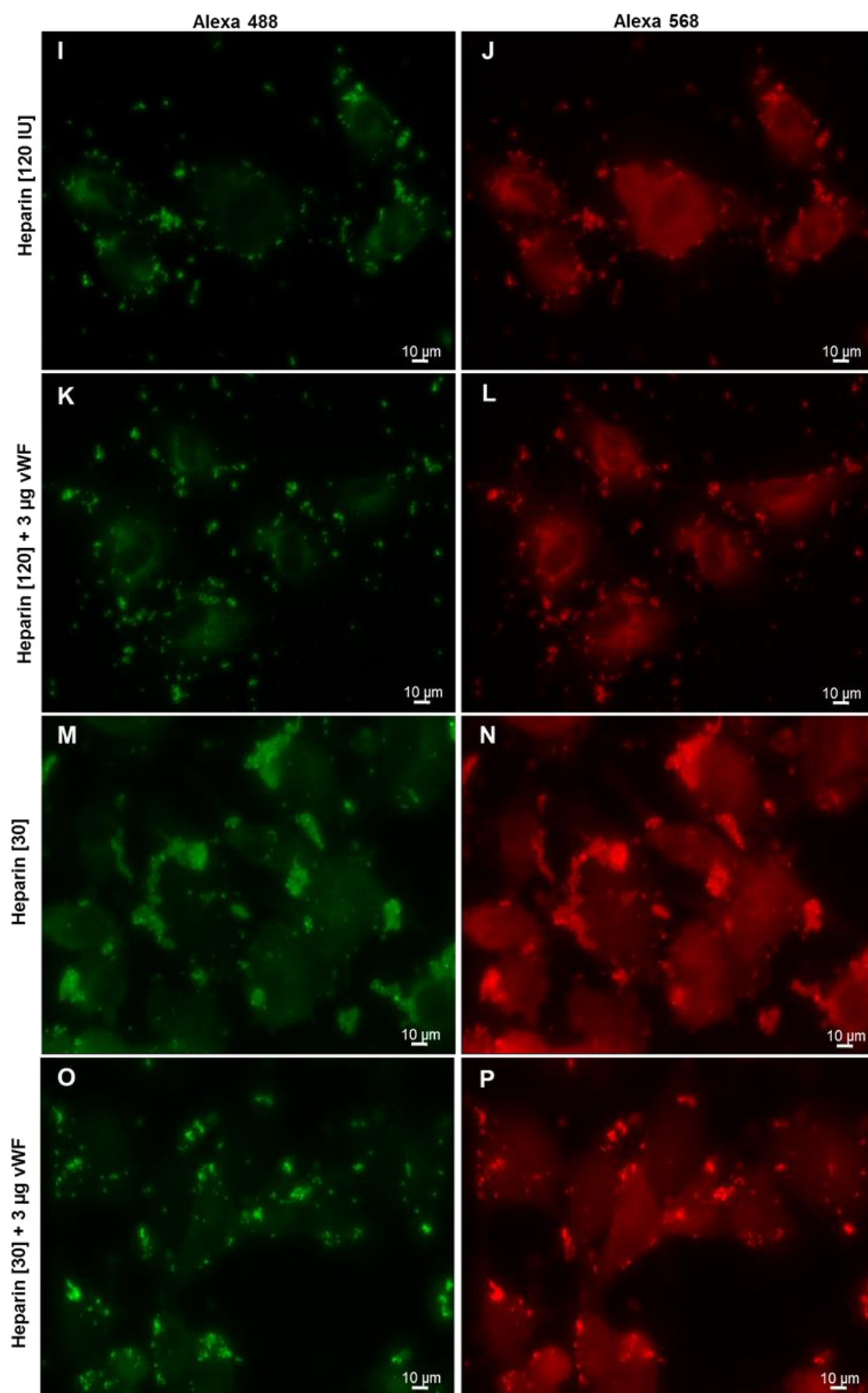
Abbildung 6-17: Fluoreszenzvisualisierung der Flusskultivierung mit Pneumokokken (PM40) bei Histaminzugabe und in Gegenwart von Heparin für 30 min (A) und 90 min (B)

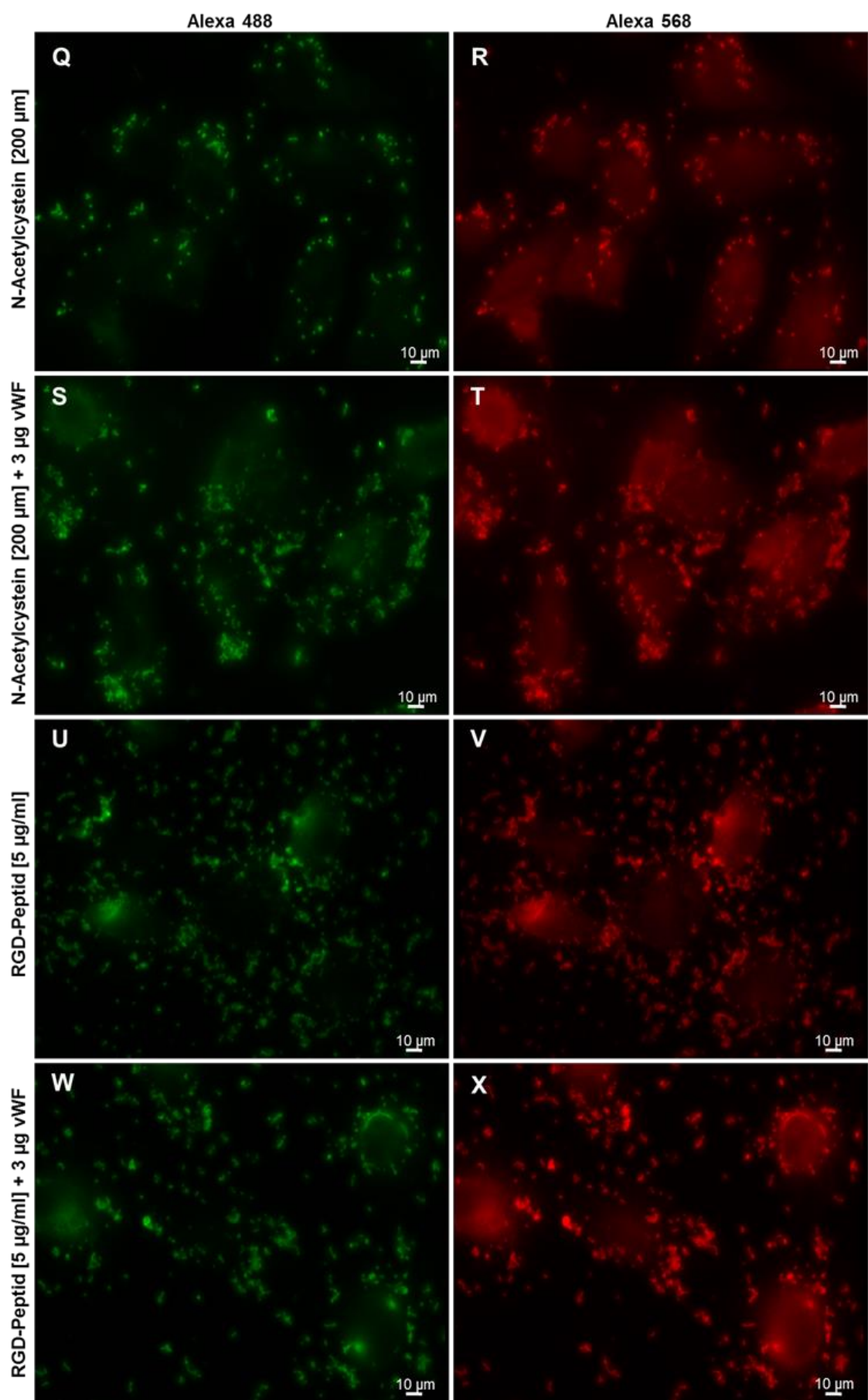
Die Darstellung der roten Fluoreszenz (RFP-Pneumo) belegt, dass weder an den HUVECs noch an VWF-Fäden Pneumokokken detektiert wurden wenn zusätzlich 30 IU Heparin/mL zur Flussinfektion hinzugegeben wurden. Im Hellfeld (HF) ist die Endothelzellschicht zu erkennen. Dabei sind einige VWF-Fäden mit einem gelben Pfeil markiert, während die weißen Pfeile auf globuläre VWF-Moleküle hinweisen. Es konnte das Auftreten beider Konformationen beobachtet werden auch in Gegenwart von 30 IU/mL Heparin.

6.6. Repräsentative Bildausschnitte der Inhibitionsstudien der VWF-Eno-Interaktion

In den folgenden Abbildungen sind repräsentativen Bildausschnitte der Versuche der Charakterisierung der VWF-vermittelten Adhärenz an HUVECs durch Inhibitionsstudien mit Bindungs-Modulatoren in der Infektionsanalysen dargestellt. Bei der Versuchsvariante I wurden die Endothelzellen mit VWF, Histamin, Heparin, N-Acetylcystein, RGD-Peptiden und RGE-Peptiden vorinkubiert. Dabei wurden die jeweiligen Komponenten zusammen mit 3 µg VWF zu den Endothelzellen gegeben. In der Variante II wurden zunächst die Pneumokokken mit VWF und den einzelnen Komponenten: Plasminogenbindungspeptid, Heparin, N-Acetylcystein, „short peptide“ und „long peptide“ vorinkubiert. Die Komponenten wurden zusätzlich ohne VWF als Kontrolle zu den Endothelzellen gegeben.







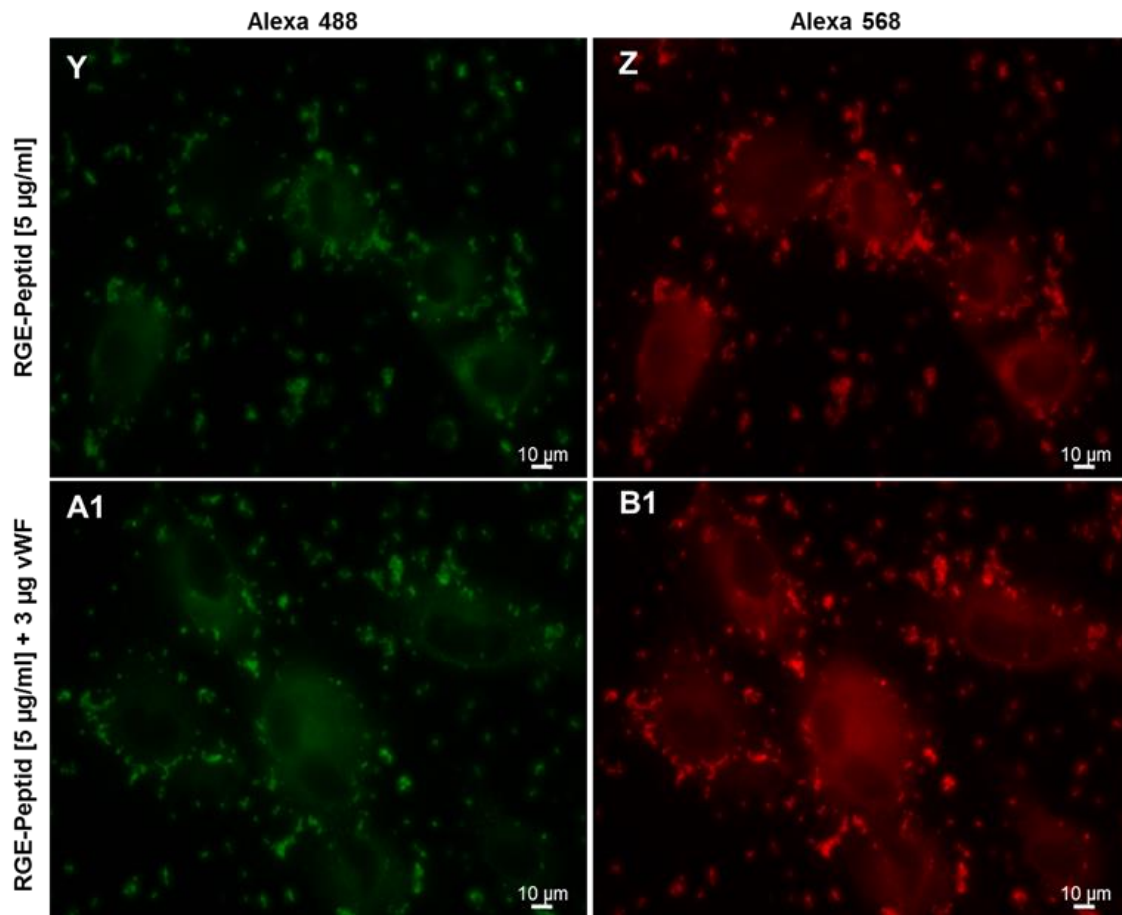
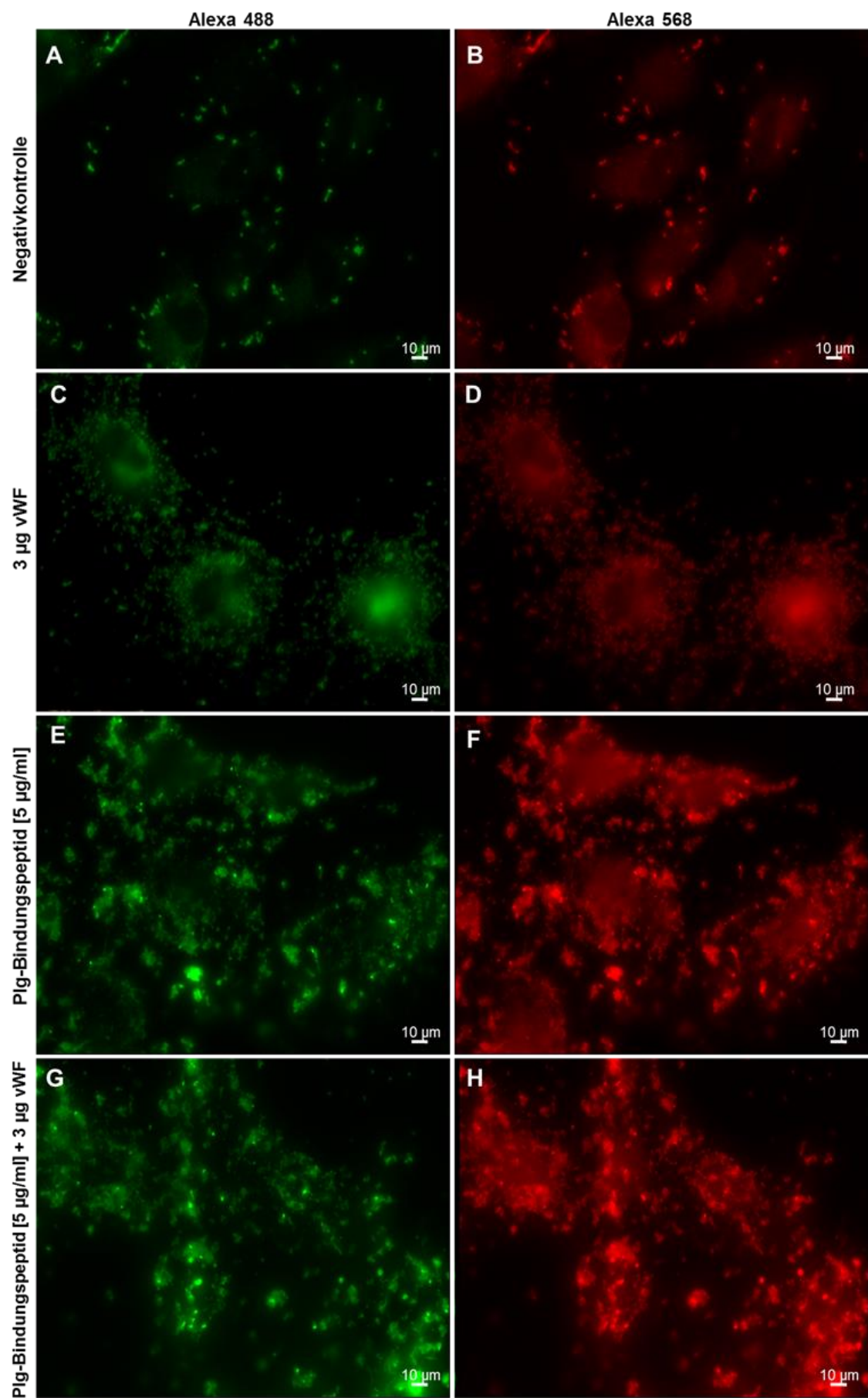
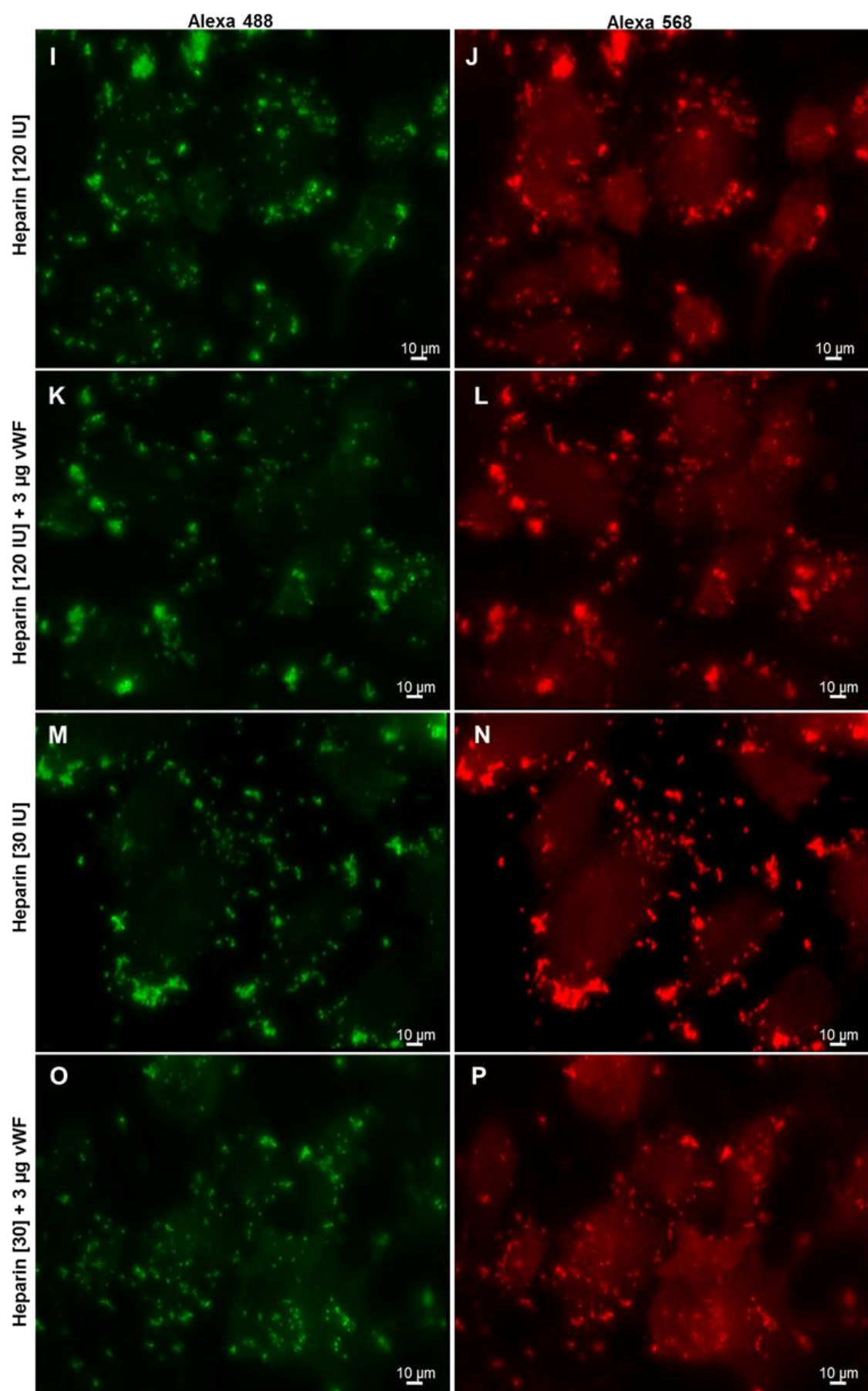
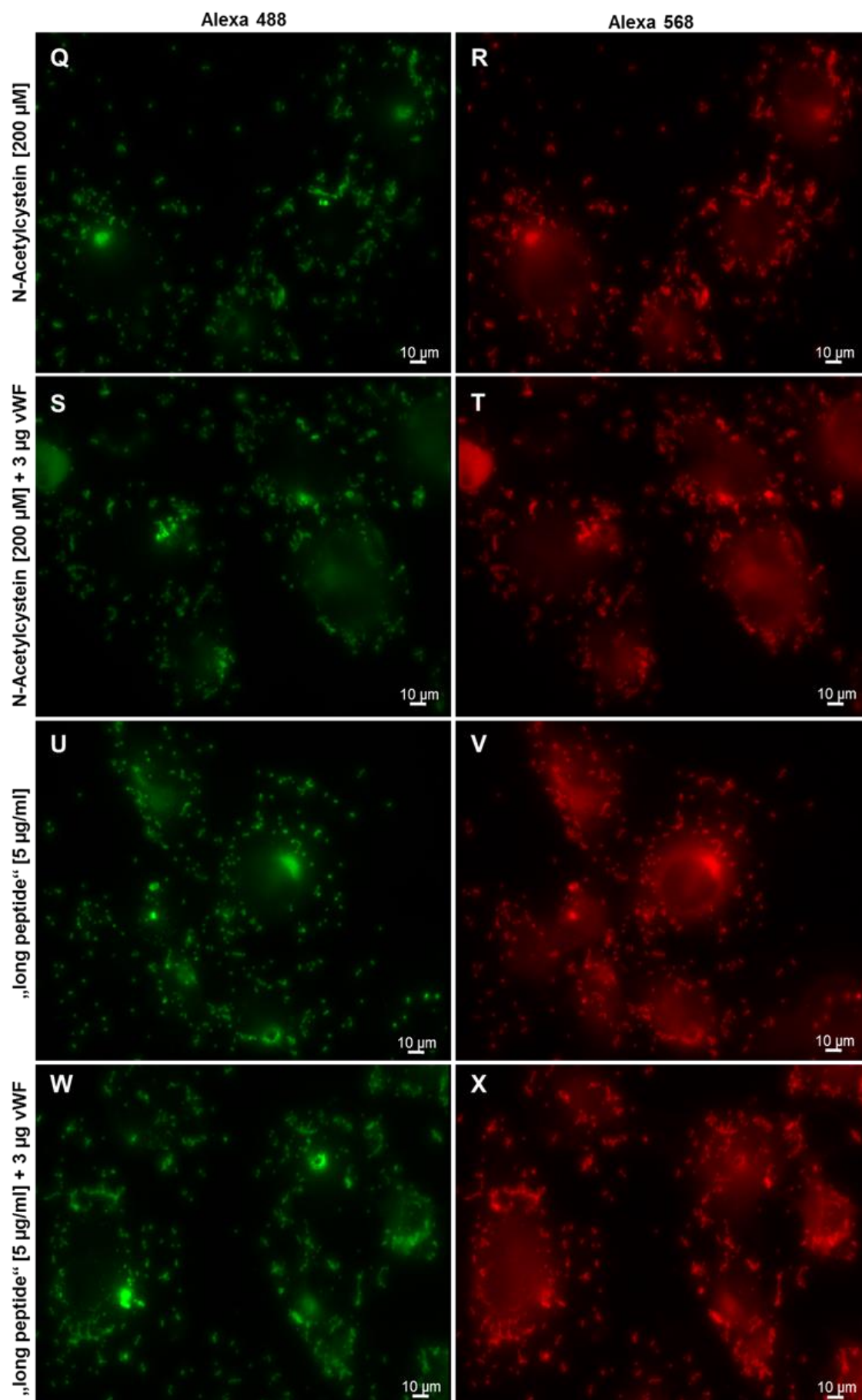


Abbildung 6-18: Fluoreszenzaufnahmen der Einzelkanäle von repräsentativen Bereichen der Infektionsanalysen mit Endothelzellen (Variante I)

Die Überlagerungsbilder sind in Abbildung 12 zu sehen. Die Aufnahmen wurden mit dem Laser Scanning Mikroskop Leica DMI8, mit dem 63x Ölimmersionsobjektiv erstellt. Die Aufnahmen wurden mit der LasX Software bearbeitet. Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Abbildung aus der Bachelorarbeit von Karen Lahme, 2017.







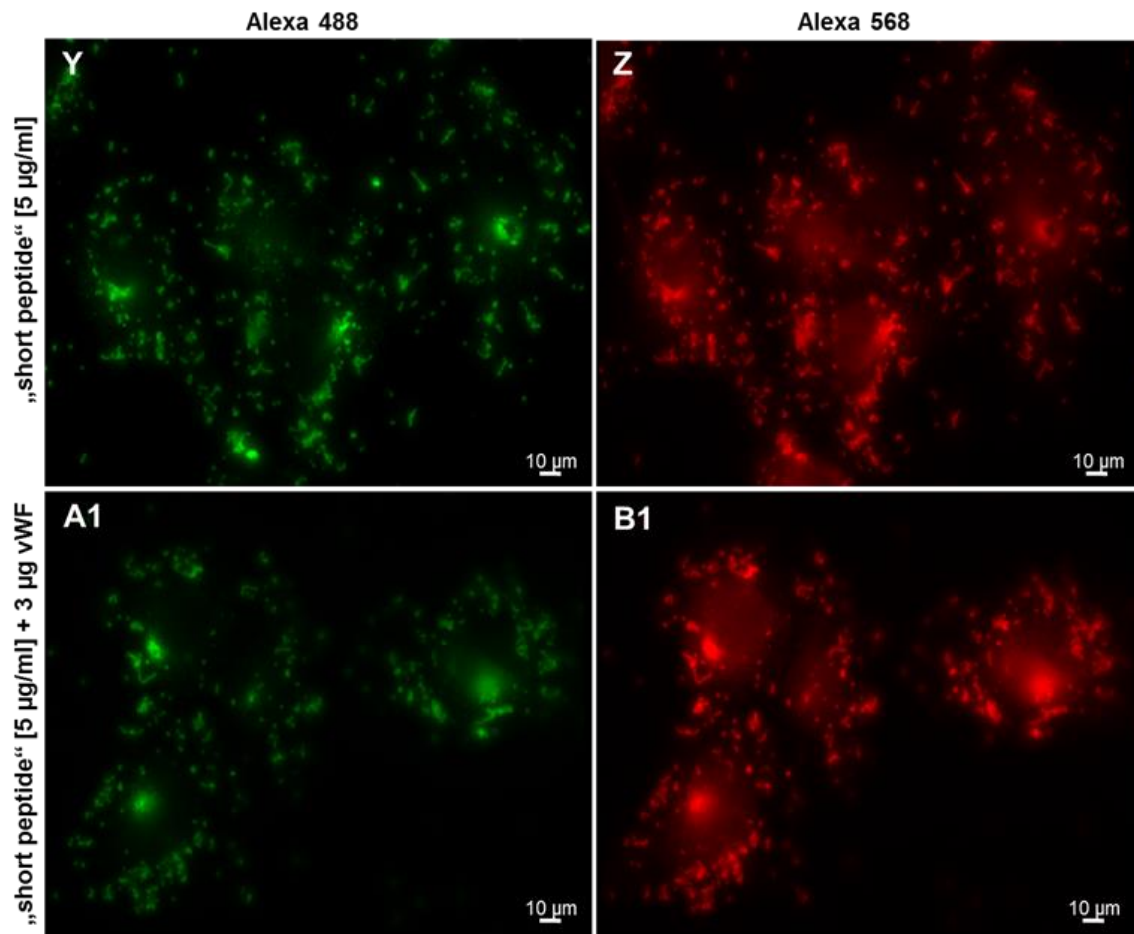


Abbildung 6-19: Fluoreszenzaufnahmen der Einzelkanäle der Infektionsanalyse mit Pneumokokken-Vorinkubation (Variante II)

Die Überlagerungsbilder sind in Abbildung 14 zu sehen. Die Aufnahmen wurden mit dem Laser Scanning Mikroskop Leica DMI8, mit dem 63x Ölimmersionsobjektiv erstellt. Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Die Aufnahmen wurden mit der LasX Software bearbeitet. Abbildung aus der Bachelorarbeit von Karen Lahme, 2017.

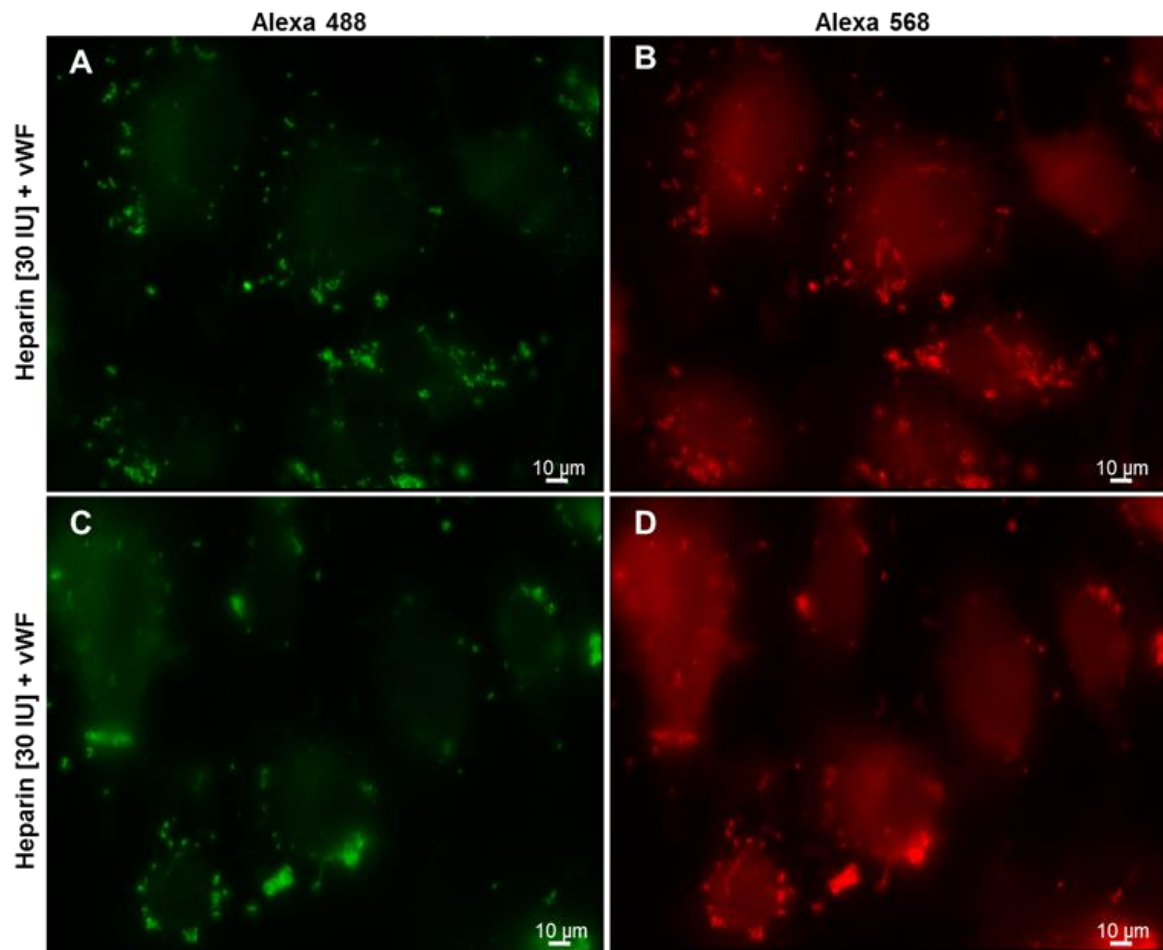


Abbildung 6-20: Fluoreszenzaufnahmen und vergrößerte Bildausschnitte von adhärennten und invasiven Pneumokokken an und in humanen Endothelzellen.

Die Überlagerungsbilder sind in Abbildung 15 zu sehen. Die Aufnahmen wurden mit dem Laser Scanning Mikroskop Leica DMI8, mit dem 63x Ölimmersionsobjektiv erstellt. Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Die Bilder wurden mit der LasX Software bearbeitet. Abbildung aus der Bachelorarbeit von Karen Lahme, 2017.

7 Abkürzungsverzeichnis

xg	Erdbeschleunigung als Multiplikand
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cam	Chloramphenicol-Resistenzgen
CCD	Charged-coupled device (ladungsgekoppeltes Bauteil)
cm ²	Quadratzentimeter
CSP	Competence-stimulating peptide (kompetenzstimulierendes Peptid)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
dpf	für <i>days post fertilization</i>
dyn/cm ²	CGS-Einheit der Kraft; Ein dyn entspricht der Kraft, die notwendig ist, um eine Masse von 1 g mit 1 cm/s ² zu beschleunigen
ECBM	Endothelial Cell Basal Medium
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium (Kultivierungsmedium für Endothelzellen)
Eno	Enolase
EZM	extrazellulären Matrix
FCS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
HlpA	Histone-like protein A
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen)

IR	Infrarot
KBE	koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
K _d Wert	Wert der Dissoziationskonstante
L	Liter
LB	Lysogeny broth (Komplexmedium)
LED	Leuchtdiode
LRP1	Low-density lipoprotein receptor-related protein-1
mg	Milligramm
min.	Minute(n)
mL	Milliliter
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
nM	Nanomolar
OD ₆₀₀	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm, gemessen im Einstrahlphotometer
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PI	Pixel-Intensität
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RKI	Robert-Koch-Institut
s	Sekunde(n)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
TEMED	Tetramethylethylenediamin
THY	Todd-Hewitt & Yeast
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
VWF	Von Willebrand Faktor
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WPB	Weibel-Palade-Bodies

8 Literaturverzeichnis

Aaronson R. M., Graven K. K., Tucci M., Mc Donald R. J., Farber H. W. Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. 1995; J Biol Chem. 270(46):27752-7.

Abdullah, M.R., Dissertation. Functional and structural characterization of DacB and PccL, lipoproteins contributing to pneumococcal pathogenesis. 2014, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.

Abdullah, M.R., Gutierrez-Fernandez, J., Pribyl, T., Gisch, N., Saleh, M., Rohde, M., et al. Structure of the pneumococcal l,d-carboxypeptidase DacB and pathophysiological effects of disabled cell wall hydrolases DacA and DacB. 2014, Mol Microbiol 93 (6) S. 1183–1206.

Agarwal S., Kulshreshtha P., Bambah Mukku D., Bhatnagar R. alpha-Enolase binds to human plasminogen on the surface of Bacillus anthracis. Biochim Biophys Acta. 2008;1784(7-8):986-94.

Agarwal V., Asmat T. M., Luo S., Jensch I, Zipfel P. F., Hammerschmidt S. Complement regulator Factor H mediates a two-step uptake of Streptococcus pneumoniae by human cells. 2010; J Biol Chem. 285(30):23486-95.

Alhamdi Y., Neill D. R., Abrams S. T., Malak H. A., Yahya R., Barrett-Jolley R. et al. Circulating Pneumolysin Is a Potent Inducer of Cardiac Injury during Pneumococcal Infection. 2015; PLoS Pathog. 11(5): e1004836.

Alves-Barroco C., Roma-Rodrigues C., Raposo L. R., Brás C., Diniz M., Caço J., Costa P. M. et al. Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae isolated from milk of the bovine udder as emerging pathogens: In vitro and *in vivo* infection of human cells and zebrafish as biological models. 2018; Microbiologyopen.: e00623.

Ampofo K., Pavia A. T., Chris S., Hersh A. L., Bender J. M., Blaschke A. J., et al. The changing epidemiology of invasive pneumococcal disease at a tertiary children's hospital through the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine era: a case for continuous surveillance. 2012; Pediatr Infect Dis J. 31(3):228-34.

Auton, M., Cruz, M.A. und Moake, J. Conformational stability and domain unfolding of the Von Willebrand factor A domains. 2007; J Mol Biol 366 (3) S. 986–1000.

Auwerx, J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. 1991, Experientia 47 S. 22–31.

- Bergenfels C., Hakansson A. P. *Streptococcus pneumoniae* Otitis Media Pathogenesis and How It Informs Our Understanding of Vaccine Strategies. 2017; *Curr Otorhinolaryngol Rep.* 5(2):115-124.
- Bergmann, S., Frank, R., Diekmann, O., Wild, D., Bracht, D. and Hammerschmidt, S. Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 2003; 49(2):411-23.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S. and Hammerschmidt, S. "-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol.* 2001;40(6):1273-87.
- Bergmann, S., Rohde, M., Hammerschmidt S. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasmin(ogen)-binding protein. *Infect Immun.* 2004; 72(4): 2416–2419.
- Bergmann, S., Rohde, M., Preissner, K. T., Hammerschmidt, S. The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thrombosis and Haemostasis*, 94(2): 304-311. *Thromb Haemost.* 2005; 94(2):304-11.
- Bergmann, S., Hammerschmidt S. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost.* 2007; 98(3):512-20.
- Bergmann, S., Lang, A., Rohde, M., Rennemeier, C., Grashoff C., Preissner, K. T., Hammerschmidt, S. Integrin-linked kinase is required for vitronectin-mediated internalization of *Streptococcus pneumoniae* by host cells. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 2):256-67. doi: 10.1242/jcs.035600.
- Bergmann, S., Schoenen, H., Hammerschmidt S. The interaction between bacterial enolase and plasminogen promotes adherence of *Streptococcus pneumoniae* to epithelial and endothelial cells. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(8):452-62. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.06.002. Epub 2013 Jun 10.
- Binsker, U., Kohler, T.P., Krauel, K., Kohler, S., Schwertz, H. und Hammerschmidt, S. Pneumococcal Adhesins PavB and PspC Are Important for the Interplay with Human Thrombospondin-1. 2015; *J Biol Chem* 290 (23) S. 14542–14555.

Binsker U., Kohler T. P., Krauel K., Kohler S., Habermeyer J., Schwertz H., Hammerschmidt S. Serotype 3 pneumococci sequester platelet-derived human thrombospondin-1 via the adhesin and immune evasion protein Hic. 2017; J Biol Chem. 292(14):5770-5783.

Bjerketorp, J., Nilsson, M., Ljungh, A., Flock, J.-I., Jacobsson, K. und Frykberg, L. A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus*. 2002; Microbiology 148 S. 2037–2044.

Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J. und Gotschlich, E.C. A Rapid, Sensitive Method for Detection of Alkaline Phosphatase-Conjugated Anti-antibody on Western Blots. 1984; Analytical Biochemistry 136 S. 175–179.

Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. 1987; Electrophoresis 8 (2) S. 93–99.

Bogaert, D., Groot, R. de und Hermans, P.W. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: The key to pneumococcal disease. 2004; The Lancet Infectious Diseases 4 (3) S. 144–154.

Borst L. B., Patterson S. K., Lanka S., Suyemoto M. M., Maddox C. W. Zebrafish (*Danio rerio*) as a screen for attenuation of Lancefield group C streptococci and a model for streptococcal pathogenesis. 2013; Vet Pathol. 50(3):457-67.

Brehm M. A., Huck V., Aponte-Santamaría C., Obser T., Grässle S., Oyen F. et al. von Willebrand disease type 2A phenotypes IIC, IID and IIE: A day in the life of shear-stressed mutant von Willebrand factor. 2014; Thromb Haemost. 112(1):96-108.

Briles D. E., Crain M. J., Gray B. M., Forman C., Yother J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 1992; 60(1):111-6.

Brown A. O., Mann B., Gao G., Hankins J. S., Humann J., Giardina J. et al. *Streptococcus pneumoniae* translocates into the myocardium and forms unique microlesions that disrupt cardiac function. 2014; PLoS Pathog. 10(9): e1004383.

Brueggemann A. B., Peto T. E., Crook D. W., Butler J. C., Kristinsson K. G., Spratt B. G. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. 2004; J Infect Dis. 190(7):1203-11.

Candela M., Biagi E., Centanni M., Turrone S., Vici M., Musiani F. Bifidobacterial enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host. 2009; Microbiology. 155(Pt 10):3294-303.

Canvin J. R., Marvin A. P., Sivakumaran M., Paton J. C., Boulnois G. J., Andrew P. W., Mitchell T. J. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. 1995; *J Infect Dis.* 172(1):119-23.

Cartwright K. Pneumococcal disease in western Europe: burden of disease, antibiotic resistance and management. 2002; *Eur J Pediatr.* 161(4):188-95.

Casari, C., Berrou, E., Lebret, M., Adam, F., Kauskot, A., Bobe, R., et al. von Willebrand factor mutation promotes thrombocytopathy by inhibiting integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. 2013; *The Journal of Clinical Investigation* 123 (12) S. 5071–5081.

Centers for Disease Control and Prevention. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, *Streptococcus pneumoniae*, 2008. <https://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/pubs-strep-pneumo.html>

Chavakis T., Wiechmann K., Preissner K. T., Herrmann M. Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. 2005; *Thromb Haemost.* 94(2):278-85.

Cheng, Q., Campbell, E.A., Naughton, A.M., Johnson, S. und Masure, H.R. The com locus controls genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. 1997, *Mol Microbiol* 23 (4) S. 683–692.

Chiavolini D., Pozzi G., und Ricci S. Animal Models of *Streptococcus pneumoniae* Disease. 2008; *Clin Microbiol Rev.* 21(4): 666–685.

Claes J., Vanassche T., Peetermans M., Liesenborghs L., Vandenbriele C., Vanhoorelbeke K., Missiakas D. et al. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to the vessel wall under flow is mediated by von Willebrand factor-binding protein. 2014; *Blood.* 124(10):1669-76.

Claes, J., Liesenborghs, L., Peetermans, M., Veloso, T.R., Missiakas, D., Schneewind, O., et al. Clumping factor A, von Willebrand factor-binding protein and von Willebrand factor anchor *Staphylococcus aureus* to the vessel wall. 2017; *J Thromb Haemost* 15 (5) S. 1009–1019.

Claverys J. P., Martin B., Håvarstein L. S. Competence-induced fratricide in streptococci. 2007; *Mol Microbiol.* 64(6):1423-33.

Crawley, J.T.B., Groot, R. de, Xiang, Y., Luken, B.M. und Lane, D.A. Unraveling the scissile bond: How ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. 2011; *Blood* 118 (12) S. 3212–3221.

- Cron, L.E., Bootsma, H.J., Noske, N., Burghout, P., Hammerschmidt, S. und Hermans, P.W.M. Surface-associated lipoprotein PpmA of *Streptococcus pneumoniae* is involved in colonization in a strain-specific manner. 2009; *Microbiology* 155 (Pt 7) S. 2401–2410.
- Crotty M. P., Meyers S., Hampton N., Bledsoe S., Ritchie D. J., Buller R. S., Storch G. A., Micek S. T., Kollef M. H. Epidemiology, Co-Infections, and Outcomes of Viral Pneumonia in Adults: An Observational Cohort Study. 2015; *Medicine (Baltimore)*. 94(50): e2332.
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I. und Tuomanen, E.I. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. 1995, *Nature* 377 S. 435– 438.
- Dahlbäck, B. Blood coagulation. 2000, *The Lancet* 355 (9215) S. 1627–1632.
- Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K.B. und Dockrell, D.H. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. 2010; *PLoS One* 5 (1) S. e8668.
- Dang L. T., Purvis A. R., Huang R. H., Westfield L. A., Sadler J. E. Phylogenetic and functional analysis of histidine residues essential for pH-dependent multimerization of von Willebrand factor. 2011; *J Biol Chem*. 286(29):25763-9.
- Dave, S., Carmicle, S., Hammerschmidt, S., Pangburn, M.K. und McDaniel, L.S. Dual Roles of PspC, a Surface Protein of *Streptococcus pneumoniae*, in Binding Human Secretory IgA and Factor H. 2004; *The Journal of Immunology* 173 (1) S. 471–477.
- Del Amo E, Esteva C, Hernandez-Bou S, Galles C, Navarro M, Sauca G, et al. Serotypes and Clonal Diversity of *Streptococcus pneumoniae* Causing Invasive Disease in the Era of PCV13 in Catalonia, Spain. 2016; *PLoS One*. 11(3): e0151125.
- Deibel, R.H. and Seeley, H.W. *Streptococcaceae* fam. Nov. 1974; In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn, ed Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. pp. 490–509. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Deis, L. N., Wu, Q., Wang, Y., Qi, Y., Daniels, K. G., Zhou, P., und Oas. T. G., 2015 Suppression of conformational heterogeneity at a protein–protein interface. 2015; *PNAS* 112 (29) 9028-9033.
- de Lucas-Ramos P, Izquierdo-Alonso J. L., Moro J. M. R. G., Frances J. F., Lozano P. V., Bellón-Cano J. M. Chronic obstructive pulmonary disease as a cardiovascular risk factor.

Results of a case-control study (Consiste study). 2012; *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 7: 679–686.

Dockrell D. H., Whyte M. K. B., Mitchell T. J. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. 2012; *Chest*. 142(2):482-491.

Domon, H., Oda, M., Maekawa, T., Nagai, K., Takeda, W. und Terao, Y. *Streptococcus pneumoniae* disrupts pulmonary immune defence via elastase release following pneumolysin-dependent neutrophil lysis. 2016; *Sci Rep* 6 S. 38013.

Dong, J.-f., Moake, J.L., Nolasco, L., Bernardo, A., Arceneaux, W., Shrimpton, C.N. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. 2002; *Blood* 100 (12) S. 4033–4039.

Dudani A. K., Cummings C., Hashemi S., Ganz P. R. Isolation of a novel 45 kDa plasminogen receptor from human endothelial cells. 1993; *Thromb Res*. 69(2):185-96.

Ehinger, S., Schubert, W.-D., Bergmann, S., Hammerschmidt, S. und Heinz, D.W. Plasmin(ogen)-binding alpha-Enolase from *Streptococcus pneumoniae*: Crystal structure and evaluation of plasmin(ogen)-binding sites. 2004; *J Mol Biol* 343 (4) S. 997–1005.

Eldholm V., Johnsborg O., Haugen K., Ohnstad H. S., Håvarstein L. S. Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. 2009 Jul; *Microbiology*. 155(Pt 7):2223-34.

Elm C., Rohde M., Vaerman J. P., Chhatwal G. S., Hammerschmidt S. Characterization of the interaction of the pneumococcal surface protein SpsA with the human polymeric immunoglobulin receptor (hIgR). 2004; *Indian J Med Res*. 119 Suppl:61-5.

Ercoli G., Fernandes V. E., Chung W. Y., Wanford J. J., Thomson S., Bayliss C. D. et al. Intracellular replication of *Streptococcus pneumoniae* inside splenic macrophages serves as a reservoir for septicaemia. 2018; *Nat Microbiol*. 3(5):600-610.

Fairbairn L., Kapetanovic R., Sester D. P., Hume D. A. The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. 2011; *J Leukoc Biol*. 89(6):855-71.

Feo S., Oliva D, Barbieri G, Xu W. M., Fried M., Giallongo A. The gene for the muscle-specific enolase is on the short arm of human chromosome 17. 1990; *Genomics*. 6(1):192-4.

Fletcher L., Rider C.C., Taylor C.B. Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. 1976; *Biochimica et Biophysica Acta*. 452(1):245-252.

Floden A. M., Watt J. A., Brissette C. A. *Borrelia burgdorferi* enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein. 2011; *PLoS One*. 6(11): e27502.

Fontán P. A., Pancholi V., Nociari M. M., Fischetti V. A. Antibodies to streptococcal surface enolase react with human alpha-enolase: implications in poststreptococcal sequelae. 2000; *J Infect Dis*. 182(6):1712-21.

Flood V. H., Schlauderaff A. C., Haberichter S. L., Slobodianuk T. L., Jacobi P. M., Bellissimo D. B. et al. Crucial role for the VWF A1 domain in binding to type IV collagen. 2015; *Blood*. 125(14):2297-304.

Fujimura Y., Titani K., Holland L. Z., Russell S. R., Roberts J. R., Elder J. H. et al. von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. 1986; *J Biol Chem*. 261(1):381-5.

Fulde M., Steinert M., Bergmann S. Interaction of streptococcal plasminogen binding proteins with the host fibrinolytic system. 2013; *Front Cell Infect Microbiol*. 3:85.

Ghosh A., Vo A., Twiss B. K., Kretz C. A., Jozwiak M. A., Montgomery R. R., Shavit J. A. Characterization of zebrafish von Willebrand factor reveals conservation of domain structure, multimerization, and intracellular storage. 2012; *Adv Hematol*. 2012:214209.

Ghosh A., Vo A., Twiss B. K., Kretz C. A., Jozwiak M. A., Montgomery R. R., Shavit J. A. Corrigendum to "Characterization of Zebrafish von Willebrand Factor Reveals Conservation of Domain Structure, Multimerization, and Intracellular Storage". 2015; *Adv Hematol*. 2015:526854.

Giallongo A., Feo S., Moore R., Croce C.M., Showe L.C. Molecular cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human alpha enolase. 1986; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(18):6741-5.

Gogia S., Neelamegham S. Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and related blood disorders. 2015; *Biorheology*. 52(5-6):319-35.

Goligorsky M. S., Patschan D, Kuo M. C. Weibel-Palade bodies--sentinels of acute stress. 2009; *Nat Rev Nephrol*. 5(7):423-6. doi: 10.1038/nrneph.2009.87.

Gómez-Mejia A., Gámez G., Hirschmann S., Kluger V., Rath H., Böhm S. et al. Pneumococcal Metabolic Adaptation and Colonization Are Regulated by the Two-Component Regulatory System 08. 2018; mSphere. 3(3). pii: e00165-18.

Gould J. M., Weiser J. N. The inhibitory effect of C-reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet-activating factor receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. 2002; J Infect Dis. 186(3):361-71.

Gragnano F., Crisci M., Bigazzi M. C., Bianchi R., Sperlongano S., Natale F. et al. Von Willebrand Factor as a Novel Player in Valvular Heart Disease: From Bench to Valve Replacement. 2018; Angiology. 69(2):103-112.

Gresele P. und Momi S. Inhibitors of the interaction between von Willebrand factor and platelet GPIb/IX/V. 2012; Handb Exp Pharmacol. (210):287-309.

Hahn, Kaufmann, Schulz und Suerbaum. Medizinische Mikrobiologie und Infektionsbiologie. 2008; Springer Verlag. ISBN-13: 978-3540463597

Hammerschmidt S., Bethe G., Remane P. H., Chhatwal G. S. Identification of Pneumococcal Surface Protein A as a Lactoferrin-Binding Protein of *Streptococcus pneumoniae*. 1999; Infection and Immunity, Vol. 67, No. 4, p. 1683–1687

Hammerschmidt S., Susanne R. Talay S. R., Brandtzaeg P., Chhatwal G. S. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory Immunoglobulin A and secretory component. Molecular Microbiology. 1997; 25(6), 1113–1124

Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Muller, E. und Rohde, M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. 2005; Infect Immun 73 (8) S. 4653–4667.

Hammerschmidt S. Adherence molecules of pathogenic pneumococci. 2006; Curr Opin Microbiol. 9(1):12-20.

Hanumanthaiah R., Day K., Jagadeeswaran P. Comprehensive analysis of blood coagulation pathways in teleostei: evolution of coagulation factor genes and identification of zebrafish factor VIII. 2002; Blood Cells Mol Dis. 29(1):57-68.

Hartleib, J., Köhler, N., Dickinson, R.B., Chhatwal, G.S., Sixma, J.J., Hartford, O.M., et al. ProteinA is the vonWillebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. 2000; Blood 96 (6) S. 2149–2156.

Havarstein, L.S., Coomaraswamy, G. und Morrison, D.A. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. 1995; *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (24) S. 11140–11144.

Henriques-Normark B., Tuomanen E. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. 2013; *Cold Spring Harb Perspect Med.*;3(7). pii: a010215.

Hermans, P.W.M., Adrian, P.V., Albert, C., Estevao, S., Hoogenboezem, T., Luijendijk, I.H.T., et al. The streptococcal lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonization. 2006; *J Biol Chem* 281 (2) S. 968–976.

Högberg L., Geli P., Ringberg H., Melander E., Lipsitch M., Ekdahl K. Age- and serogroup-related differences in observed durations of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant pneumococci. 2007; *J Clin Microbiol.* 45(3):948-52.

Holmes, A.R., McNab, R., Millsap, K.W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J.L. und Jenkinson, H.F. The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. 2001; *Mol Microbiol* 41 (6) S. 1395–1408.

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. 2013; *Nature.* 496(7446):498-503.

Huppelsberg J. und Walter K. *Kurzlehrbuch Physiologie*, Thieme; Auflage: 4. aktualisierte (21. August 2013). ISBN-13: 978-3131364333

Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. 2010;78(2):704-15.

Hyams C.1, Yuste J., Bax K., Camberlein E., Weiser J. N., Brown J. S. *Streptococcus pneumoniae* resistance to complement-mediated immunity is dependent on the capsular serotype. 2010; *Infect Immun.* 78(2):716-25.

Iida H. und Yahara I. Yeast heat-shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase. 1985; *Nature* volume 315, pages 688–690.

Ishiekwene C., Ghitan M., Kuhn-Basti M., Chapnick E., Lin Y. S. *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis with destruction of the ventricular septum and multiple native valves. 2016; *ID Cases.* 7:14-15.

- Jacobs, M.R., Koornhof, H.J., Robins-Browne, R.M., Stevenson, C.M., Vermaak, Z.A., Freiman, I., et al. 1978; Emergence of Multiply Resistant Pneumococci. *N Engl J Med* 299 S. 735–740.
- Jeffery C. J. Moonlighting proteins. 1999; *Trends Biochem Sci.* 24(1):8-11.
- Jagadeeswaran P. Zebrafish: a tool to study hemostasis and thrombosis. 2005; *Curr Opin Hematol.* 12(2):149-52.
- Jensch, I., Gamez, G., Rothe, M., Ebert, S., Fulde, M., Somplatzki, D., et al. PavB is a surface-exposed adhesin of *Streptococcus pneumoniae* contributing to nasopharyngeal colonization and airways infections. 2010; *Mol Microbiol* 77 (1) S. 22–43.
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C.J., Braun, D., Baaske, P. und Duhr, S. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. 2011; *Assay Drug Dev Technol* 9 (4) S. 342–353.
- Jim K.K., Engelen-Lee J., van der Sar A.M., Bitter W., Brouwer M., van der Ende A., et al. Vandenbroucke-Grauls C.M. Infection of zebrafish embryos with live fluorescent *Streptococcus pneumoniae* as a real-time pneumococcal meningitis model. 2016; *Journal of Neuroinflammation* 13:188
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C. und Andrew, P.W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. 2008; *Nat Rev Microbiol* 6 (4) S. 288–301.
- Kamei M, Saunders W. B., Bayless K. J., Dye L., Davis G. E. und Weinstein B. M. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles *in vivo*. 2006; *Nature* volume 442, pages 453–456.
- Katoa K., Asaia R., Shimizua A. Suzukia F., Ariyoshib Y. Immunoassay of three enolase isozymes in human serum and in blood cells. 1983; *Clinica Chimica Acta*, Volume 127, Issue 3, Pages 353-363.
- Kawecki C., Lenting P. J., Denis C. V. von Willebrand factor and inflammation. 2017; *J Thromb Haemost.* 15(7):1285-1294.
- Keller, L.E., Robinson, D.A. und McDaniel, L.S. Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and Pathogenesis. 2016; *MBio* 7 (2) e01792.

- Kerr, A.R., Adrian, P.V., Estevao, S., Groot, R. de, Alloing, G., Claverys, J.-P., et al. The AmiA/AmiB permease of *Streptococcus pneumoniae* is involved in nasopharyngeal colonization but not in invasive disease. 2004; *Infect Immun* 72 (7) S. 3902–3906.
- Khan M. N., Pichichero M. E. The host immune dynamics of pneumococcal colonization: implications for novel vaccine development. 2014; *Hum Vaccin Immunother.* 10(12):3688-99.
- Kjos, M., Aprianto, R., Fernandes, V.E., Andrew, P.W., van Strijp, J.A.G., Nijland, R. und Veening, J.-W. Bright fluorescent *Streptococcus pneumoniae* for live-cell imaging of host-pathogen interactions. 2015; *J Bacteriol* 197 (5) S. 807–818.
- Kjos, M. und Veening, J.-W. Tracking of chromosome dynamics in live *Streptococcus pneumoniae* reveals that transcription promotes chromosome segregation. 2014; *Mol Microbiol* 91 (6) S. 1088–1105.
- Kolberg J., Aase A., Bergmann S., Herstad T. K., Rødal G., Frank R. et al. *Streptococcus pneumoniae* enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. 2006; *Microbiology*. 152(Pt 5):1307-17.
- Kvietys P.R., Granger D. N. Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular pathophysiology. 1997; *Am J Physiol*. 273(6 Pt 1): G1189-99.
- Lenting, P.J., Casari, C., Christophe, O.D. und Denis, C.V. von Willebrand factor: The old, the new and the unknown. 2012; *J Thromb Haemost* 10 (12) S. 2428–2437.
- Levy G. G., Nichols W. C., Lian E. C., Foroud T., McClintick J. N., McGee B. M. et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. 2001; *Nature*. 413(6855):488-94.
- Liesenborghs L., Peetermans M., Claes J., Veloso T. R., Vandenbriele C., Criel M. et al. Shear-Resistant Binding to von Willebrand Factor Allows *Staphylococcus lugdunensis* to Adhere to the Cardiac Valves and Initiate Endocarditis. 2016; *J Infect Dis*. 213(7):1148-56.
- Löf A., Müller J. P., Brehm M. A. A biophysical view on von Willebrand factor activation. 2018; *J Cell Physiol*. 233(2):799-810.
- Löffling J., Vimberg V., Battig P., Henriques-Normark B. Cellular interactions by LPxTG-anchored pneumococcal adhesins and their streptococcal homologues. 2011; *Cell Microbiol*. 13(2):186-97.

Lüttge, M., Dissertation. Charakterisierung der Interaktion von *Streptococcus pneumoniae* mit humanem Endothel. 2011; Technische Universität Braunschweig.

Lüttge, M., Fulde, M., Talay, S.R., Nerlich, A., Rohde, M., Preissner, K.T., et al. *Streptococcus pneumoniae* induces exocytosis of Weibel-Palade bodies in pulmonary endothelial cells. 2012; *Cell Microbiol* 14 (2) S. 210–225.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. und Clark, D.P. 2013; *Brock Mikrobiologie*: Pearson. ISBN-13: 978-3868941449

Magee, A.D. und Yother, J. Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. 2001; *Infect Immun* 69 (6) S. 3755–3761.

Mair J. Progress in myocardial damage detection: new biochemical markers for clinicians. 1997; *Crit Rev Clin Lab Sci*. 34(1):1-66.

Manco, S., Hernon, F., Yesilkaya, H., Paton, J.C., Andrew, P.W. und Kadioglu, A. Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis. 2006; *Infect Immun* 74 (7) S. 4014–4020.

Mandal P., Chalmers., J. D., Choudhury G., Akram A. R., Hill A. T. Vascular complications are associated with poor outcome in community-acquired pneumonia. 2011; *An International Journal of Medicine*, Volume 104, Issue 6, Pages 489–495.

Mannino R. G., Qiu Y., Lam W. A. Endothelial cell culture in microfluidic devices for investigating microvascular processes. 2018; *Biomicrofluidics*. 12(4):042203.

Mannucci, P.M. von Willebrand Factor: A Marker of Endothelial Damage? 1998; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 S. 1359–1362.

Marshall, J.E., Faraj, B.H.A., Gingras, A.R., Lonnen, R., Sheikh, M.A., El-Mezgueldi, M., et al. The Crystal Structure of Pneumolysin at 2.0 Å Resolution Reveals the Molecular Packing of the Pre-pore Complex. 2015; *Sci Rep* 5 S. 13293.

Mariott, H.M., Mitchell, T.J. und Dockrell, D.H. Pneumolysin: A Double-Edged Sword During the HostPathogen Interaction. 2008; *Current Molecular Medicine* 8 (6) S. 497–509.

Mc Daniel L. S., Swiatlo E. Should Pneumococcal Vaccines Eliminate Nasopharyngeal Colonization? 2016; *MBio*. 7(3).

Meinel C., Spartà G., Dahse H.M., Hörhold F., König R., Westermann M. et al.. *Streptococcus pneumoniae* From Patients With Hemolytic Uremic Syndrome Binds Human Plasminogen via

the Surface Protein PspC and Uses Plasmin to Damage Human Endothelial Cells. 2018; J Infect Dis. 217(3):358-370.

Mellroth P., Daniels R., Eberhardt A., Rönnlund D., Blom H., Widengren J., Normark S., Henriques-Normark B. LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. 2012; J Biol Chem. 287(14):11018-29.

Membrebe J. D., Yoon N. K., Hong M., Lee J., Lee H., Park K., Seo S. H., Yoon I., Yoo S., Kim Y. C., Ahn J. Protective efficacy of *Streptococcus iniae* derived enolase against Streptococcal infection in a zebrafish model. 2016; Vet Immunol Immunopathol. 170:25-9.

Metcalf, D.J., Nightingale, T.D., Zenner, H.L., Lui-Roberts, W.W. und Cutler, D.F. Formation and function of Weibel-Palade bodies. 2008; J Cell Sci 121 (Pt 1) S. 19–27.

Meurens F., Summerfield A., Nauwynck H., Saif L., Gerdts V. The pig: a model for human infectious diseases. 2012; Trends Microbiol. 20(1):50-7.

Meyerhof, O. und Lohmann, K. Über die enzymatische Gleichgewichtsreaktion zwischen Hexosediphosphorsäure und Dioxyacetonphosphorsäure. 1934; Naturwissenschaften, 22 134, 271, 89.

Michaux G., Cutler D.F. How to roll an endothelial cigar: the biogenesis of Weibel-Palade bodies. 2004; Traffic. 5(2):69-78.

Miles L. A., Dahlberg C. M., Plescia J., Felez J., Kato K., Plow E. F. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. 1991; Biochemistry. 30(6):1682-91.

Moake, J., Turner, N.A., Stathopoulos, N.A., Nolasko, L.H. und Hellums, J.D. Involvement of Large Plasma von Willebrand Factor (vWF) Multimers and Unusually Large vWF Forms Derived from Endothelial Cells in Shear Stress-induced Platelet Aggregation. 1986; Journal of Clinical Investigation 78 S. 1456–1461.

Mook-Kanamori, B.B., Geldhoff, M., van der Poll, T. und van de Beek, D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. 2011; Clin Microbiol Rev 24 (3) S. 557–591.

Moore B. L., Pyeatt L. D., Kulkarni V., Panousis P., Padrez K., Doufas A. G. Reinforcement Learning for Closed-Loop Propofol Anesthesia: A Study in Human Volunteers. 2014; Journal of Machine Learning Research 15, 655-6.

MSD Sharp & Dohme GmbH Pneumovax 23, 2017; Fertigspritze. URL: https://www.msd.de/fileadmin/files/fachinformationen/pneumovax_23_fertigspritze.pdf.

Munk, K. Mikrobiologie: Taschenlehrbuch Biologie: Thieme; Auflage: 1 (24. September 2008), ISBN-13: 978-3131448613

Nakajima K., Hamanoue M., Takemoto N., Hattori T., Kato K., Kohsaka S. Plasminogen binds specifically to alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane. 1994; J Neurochem. 63(6):2048-57.

Nakamura M. M., Tasslimi A., Lieu T. A., Levine O, Knoll M. D., Russell L. B., Sinha A. Cost effectiveness of child pneumococcal conjugate vaccination in middle-income countries. 2011; International Health Volume 3. Issue 4, Pages 270-281.

Neal X. Chen N. X. und Moe S. M. Vascular Calcification: Pathophysiology and Risk Factors. 2012; Current Hypertension Reports, Volume 14, Issue 3, pp 228–237.

Niemann S., Spehr N., Van Aken H., Morgenstern E., Peters G., Herrmann M., Kehrel B. E. Soluble fibrin is the main mediator of Staphylococcus aureus adhesion to platelets. 2004; Circulation. 110(2):193-200.

Nilsson, M., Bjerketorp, J., Wiebensjo, A., Ljungh, A., Frykberg, L. und Guss, B. A von Willebrand factor-binding protein from Staphylococcus lugdunensis. 2004; FEMS Microbiol Lett 234 (1) S. 155–161.

Olmos C., Vilacosta I., Sarriá C., Fernández C., López J., Ferrera C., Vivas D., Hernández M., Sánchez-Enrique C., Ortiz C., Maroto L., San Román J. A. Characterization and clinical outcome of patients with possible infective endocarditis. 2015; Int J Cardiol. 178:31-3.

Onat D., Brillon D., Colombo P. C., Schmidt A. M. Human Vascular Endothelial Cells: A Model System for Studying Vascular Inflammation in Diabetes and Atherosclerosis. 2011; Current Diabetes Reports, Volume 11, Issue 3, pp 193–202.

O'Seaghdha M., van Schooten C. J., Kerrigan S. W., Emsley J., Silverman G. J., Cox D., Lenting P. J., Foster T. J. Staphylococcus aureus protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. 2006; FEBS J. 273(21):4831-41.

Pancholi V., Fischetti V.A. alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. 1998; J Biol Chem. 5. 273(23):14503-15.

- Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. 2001; *Cell Mol Life Sci.* 58(7):902-20.
- Pappelbaum, K.I., Gorzelanny, C., Grassle, S., Suckau, J., Laschke, M.W., Bischoff, M., et al. Ultralarge von Willebrand factor fibers mediate luminal *Staphylococcus aureus* adhesion to an intact endothelial cell layer under shear stress. 2013; *Circulation* 128 (1) S. 50–59.
- Parker, D., Soong, G., Planet, P., Brower, J., Ratner, A.J. und Prince, A. The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. 2009; *Infect Immun* 77 (9) S. 3722–3730.
- Pasumarthi K. B., Field L.J. Cardiomyocyte cell cycle regulation. 2002; *Circ Res.* 90(10):1044-54.
- Pestova, E.V., Håvarstein, L.S. und Morrison, D.A. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. 1996; *Mol Microbiol* 21 (4) S. 853–862.
- Pfizer Pharma GmbH. Prevnar 13 Injektionssuspension Fachinformation. 2017; URL: https://www.pfizermed.de/fileadmin/produkt Datenbank/pdf/012126_freigabe.pdf.
- Phillips, D.R., Charo, I.F. und Scarborough, R.M. GPIIb-IIIa: The Responsive Integrin. 1991; *Cell* 65 S. 359–362.
- Phelps H. A., Runft D. L. und Melody N. Neely M. N. Adult Zebrafish model of streptococcal infection. 2009; *Curr Protoc Microbiol.* CHAPTER: Unit–9D.1.
- Piast M., Kustrzeba-Wójcicka I., Matusiewicz M., Banaś T. Molecular evolution of enolase. 2005; *Acta Biochim Pol.* 52(2):507-13.
- Piatigorsky J. Gene sharing in lens and cornea: facts and implications. 1998; *Prog Retin Eye Res.* 17(2):145-74.
- Pilishvili T1, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. 2010; *J Infect Dis.* 201(1):32-41
- Plow E. F., Das R. Enolase-1 as a plasminogen receptor. 2009; *Blood.* 113(22):5371-2. doi: 10.1182/blood-2009-03-208546.

Pozzi, G., Masala, L., Iannelli, F., Manganelli, R., Håvarstein, L.S., Piccoli, L., et al. Competence for Genetic Transformation in Encapsulated Strains of *Streptococcus pneumoniae*: Two Allelic Variants of the Peptide Pheromone. 1996; J Bacteriol 178 (20) S. 6087–6090.

Rae N., Finch S., Chalmers J. D. Cardiovascular disease as a complication of community-acquired pneumonia. 2016; Curr Opin Pulm Med. 22(3):212-8.

Rahi A., Matta S. K., Dhiman A., Garhyan J., Gopalani M., Chandra S. et al. Enolase of *Mycobacterium tuberculosis* is a surface exposed plasminogen binding protein. 2017; Biochim Biophys Acta Gen Subj. 1861(1 Pt A):3355-3364.

Rastegarlar, G., Pegon, J.N., Casari, C., Odouard, S., Navarrete, A.-M., Saint-Lu, N., et al. Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. 2012; Blood 119 (9) S. 2126–2134.

Raugi G. J., Mumby S. M., Abbott-Brown D., Bornstein P. Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture. 1982; J Cell Biol. 95(1):351-4.

Redlitz A., Fowler B. J., Plow E. F., Miles L. A. The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. 1995; Eur J Biochem. 227(1-2):407-15.

Reneman R. S. und Hoeks A. P. G. Wall shear stress as measured *in vivo*: consequences for the design of the arterial system. 2008; Med Biol Eng Comput. 46(5): 499–507.

Restrepo M. I., Reyes L. F. Pneumonia as a cardiovascular disease. 2018; Respirology. 23(3):250-259.

Reyes L.F., Restrepo M. I., Hinojosa C. A., Soni N. J., Anzueto A., Babu B. L. et al. Severe Pneumococcal Pneumonia Causes Acute Cardiac Toxicity and Subsequent Cardiac Remodeling. 2017; Am J Respir Crit Care Med; 196(5):609-620.

RKI PneumoWeb: Laborsentinel invasiver Pneumokokken-Erkrankungen. 2007; URL: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Sentinel/Pneumoweb/Pneumoweb_node.html.

Romani de Wit T., Rondaij M. G., Hordijk P. L., Voorberg J., van Mourik J. A. Real-time imaging of the dynamics and secretory behavior of Weibel-Palade bodies. 2003; Arterioscler Thromb Vasc Biol. 23(5):755-61.

Rondaij, M.G., Bierings, R., Kragt, A., van Mourik, J.A. und Voorberg, J. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. 2006; Arterioscler Thromb Vasc Biol 26 (5) S. 1002–1007.

- Rounioja S., Saralahti A., Rantala L., Parikka M., Henriques-Normark B., Silvennoinen O., Rämetsä M. Defense of zebrafish embryos against *Streptococcus pneumoniae* infection is dependent on the phagocytic activity of leukocytes. 2012; *Dev Comp Immunol.* 36(2):342-8.
- Ruggeri, Z.M. Cell Adhesion in Vascular Biology: von Willebrand Factor. 1997; *Journal of Clinical Investigation* 99 (4) S. 559–564.
- Ruggeri Z. M. Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. 2001; *Best Practice & Research Clinical Haematology*, Volume 14, Issue 2, Pages 257-279.
- Ruggeri, Z.M. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. 2007; *Thromb Res* 120 Suppl 1 S5-S9.
- Ruoslahti E. Integrins as Receptors for Extracellular Matrix. 1991; *Cell Biology of Extracellular Matrix* pp 343-363.
- Sakai H., Goto S., Kim J. Y., Aoki N., Abe S., Ichikawa N., Yoshida M., Nagaoka Y., Handa S. Plasma concentration of von Willebrand factor in acute myocardial infarction. 2000; *Thromb Haemost.* 84(2):204-9.
- Salyers A. A., Whitt D. D. *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. 2001; Asm Pr; Auflage: 2. ISBN-13: 978-1555811716
- Sanchez C. J., Shivshankar P., Stol K., Trakhtenbroit S., Sullam P. M., Sauer K., Hermans P. W., Orihuela C. J. The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intra-species bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation *in vivo* and in biofilms. 2010; *PLoS Pathog.* 6(8):e1001044.
- Sandgren A., Sjöström K., Olsson-Liljequist B., Christensson B., Samuelsson A., Kronvall G., Henriques Normark B. Effect of clonal and serotype-specific properties on the invasive capacity of *Streptococcus pneumoniae*. 2004; *J Infect Dis.* 189(5):785-96.
- Sandgren A., Albiger B., Orihuela C. J., Tuomanen E., Normark S., Henriques-Normark B. Virulence in mice of pneumococcal clonal types with known invasive disease potential in humans. 2005; *J Infect Dis.* 192(5):791-800.
- Santana-Santos E., Gowdak L. H., Gaiotto F. A., Puig L. B., Hajjar L. A., Zeferino S. P. et al. High dose of N-acetylcystein prevents acute kidney injury in chronic kidney disease patients undergoing myocardial revascularization. 2014; *Ann Thorac Surg.* 97(5):1617-23.

- Santoriello C. und Zon L.I. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. 2012; J Clin Invest. 122(7):2337-43.
- Saralahti A., Piippo H., Parikka M., Henriques-Normark B., Rämet M., Rounioja S. Adult zebrafish model for pneumococcal pathogenesis. 2014; Dev Comp Immunol. 42(2):345-53.
- Saralahti A., Rämet M. Zebrafish and Streptococcal Infections. 2015; Scand J Immunol. 82(3):174-83.
- Saxena, S., Khan, N., Dehinwal, R., Kumar, A. und Sehgal, D. Conserved surface accessible nucleoside ABC transporter component SP0845 is essential for pneumococcal virulence and confers protection *in vivo*. 2015; PLoS One 10 (2) e0118154.
- Schäffler A. und Schmidt S., Lehrbuch und Atlas des menschlichen Körpers. Komet (1. Januar 2002). ISBN-13: 978-3898362252.
- Schneider, S.W., Nuschele, S., Wixforth, A., Gorzelanny, C., Alexander-Katz, A., Netz, R.R. und Schneider, M.F. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. 2007; PNAS 104 (19) S. 7899–7903.
- Sha J., Erova T.E., Alyea R. A., Wang S., Olano J. P., Pancholi V., Chopra A. K. Surface-expressed enolase contributes to the pathogenesis of clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. 2009; J Bacteriol. 191(9):3095-107.
- Shenoy A.T., Brissac T., Gilley R. P., Kumar N., Wang Y., Gonzalez-Juarbe N., Hinkle W. S.1, Daugherty S. C.3, Shetty A. C., Ott S., Tallon L. J., Deshane J., Tettelin H., Orihuela C. J. *Streptococcus pneumoniae* in the heart subvert the host response through biofilm-mediated resident macrophage killing. 2017; PLoS Pathog. 25;13(8): e1006582.
- Sheppard C., Fry C. K., Mushtaq S., Woodford N., Reynolds R., Janes R., et al. Rise of multidrug-resistant non-vaccine serotype 15A *Streptococcus pneumoniae* in the United Kingdom, 2001 to 2014. 2016; Euro Surveill. 21(50): 30423.
- Sobel M., McNeill P. M., Carlson P. L., Kermode J. C., Adelman B., Conroy R. et al. Heparin inhibition of von Willebrand factor-dependent platelet function *in vitro* and *in vivo*. 1991; J Clin Invest. 87(5):1787-93.
- Spiel A. O., Gilbert J. C., Jilma B. von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. 2008; Circulation. 117(11):1449-59.

Springer T. A. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. 2011; J Thromb Haemost. 9 Suppl 1:130-43.

Springer T. A. von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. 2014; Blood. 124(9):1412-25.

Sullam P. M., Bayer A. S., Foss W. M., Cheung A. L. Diminished platelet binding in vitro by *Staphylococcus aureus* is associated with reduced virulence in a rabbit model of infective endocarditis. 1996; Infect Immun. 64(12):4915-21.

Sting R. und Schwabe I. Die Pneumokokken- (*Streptococcus pneumoniae*) Infektion beim Tier, eine vom Menschen auf das Tier übertragene Infektionskrankheit - eine Anthroponose. Die Untersuchungsämter für Lebensmittelüberwachung und Tiergesundheit Baden-Württemberg, Bericht erschienen am 28.01.2011 11:17:46; URL: http://www.untersuchungsämter-bw.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema_ID=8&ID=1383&Pdf=No&lang=DE.

Takei N., Kondo J., Nagaike K., Ohsawa K., Kato K., Kohsaka S. Neuronal survival factor from bovine brain is identical to neuron-specific enolase. 1991; J Neurochem. 57(4):1178-84.

Tehranirokh M., Kouzani A. Z., Francis P. S. und Kanwar J. R. Microfluidic devices for cell cultivation and proliferation. 2013; Biomicrofluidics. 7(5): 051502.

Tersteeg C., de Maat S., De Meyer S. F., Smeets M. W., Barendrecht A. D., Roest M., Pasterkamp G., Fijnheer R., Vanhoorelbeke K., de Groot P. G., Maas C. Plasmin cleavage of von Willebrand factor as an emergency bypass for ADAMTS13 deficiency in thrombotic microangiopathy. 2014; Circulation. 129(12):1320-31.

Thomas C. P., Moore L. S., Elamin N, Doumith M., Zhang J., Maharjan S. et al. Early (2008-2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. 2013 Int J Antimicrob Agents. 42(6):531-6.

Thomer L., Schneewind O., Missiakas D. Multiple ligands of von Willebrand factor-binding protein (vWbp) promote *Staphylococcus aureus* clot formation in human plasma. 2013; J Biol Chem. 288(39):28283-92.

Thornton J. A., Durick-Eder K., Tuomanen E. I. Pneumococcal pathogenesis: "innate invasion" yet organ-specific damage. 2010; J Mol Med (Berl). 88(2):103-7.

Tilley, S.J., Orlova, E.V., Gilbert, R.J.C., Andrew, P.W. und Saibil, H.R. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. 2005; Cell 121 (2) S. 247–256.

Tomasz, A. und Hotchkiss, R.D. Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. 1964; Proceedings of the National Academy of Sciences 51 S. 480–487.

Tomasz A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis. 1997; 24 Suppl 1: S85-8.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. und Tada, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). 1980; Int. J. Cancer 26 S. 171–176.

van Schooten, C.J., Shahbazi, S., Groot, E., Oortwijn, B.D., van den Berg, H.M., Denis, C.V. und Lenting, P.J. Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII *in vivo*. 2008; Blood 112 (5) S. 1704–1712.

Vos, P. de, Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.R., et al. (ed.). 2009; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes: Springer Verlag.

Voss S., Gámez G., Hammerschmidt S. Impact of pneumococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules on colonization. 2012; Mol Oral Microbiol. 27(4):246-56.

Voss S., Hallström T., Saleh M., Burchhardt G., Pribyl T., Singh B., Riesbeck K., Zipfel P. F., Hammerschmidt S. The choline-binding protein PspC of *Streptococcus pneumoniae* interacts with the C-terminal heparin-binding domain of vitronectin. 2013; J Biol Chem. 288(22):15614-27.

Walters K. A., D'Agnillo F., Sheng Z.M., Kindrachuk J., Schwartzman L. M., Kuestner R. E., Chertow D. S., Golding B. T., Taubenberger J. K., Kash J. C. 1918 pandemic influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* co-infection results in activation of coagulation and widespread pulmonary thrombosis in mice and humans. 2016; J Pathol. 238(1):85-97.

Ware L. B., Conner E. R., Matthay M. A. von Willebrand factor antigen is an independent marker of poor outcome in patients with early acute lung injury. Dec; Crit Care Med. 2001, 2325-31.

Weiser, J.N. The pneumococcus: Why a commensal misbehaves. 2010; J Mol Med (Berl) 88 (2) S. 97–102.

Westerfield, M. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). 2000; 5th Edition, University of Oregon Press, Eugene: (Book).

Weyand A. C., Shavit J. A. Zebrafish as a model system for the study of hemostasis and thrombosis. 2014; *Curr Opin Hematol*. 21(5):418-22.

WHO Pneumonia. 2016; URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>.

Wienken, C.J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D. und Duhr, S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. 2010; *Nat Commun* 1 S. 100.

Willebrand, E.A.V. Hereditary pseudohaemophilia. 1999; *Haemophilia* 5 (3) S. 223–231.

Wohner, N., Legendre, P., Casari, C., Christophe, O.D., Lenting, P.J. und Denis, C.V. Shear stress-independent binding of von Willebrand factor-type 2B mutants p. R1306Q & p. V1316M to LRP1 explains their increased clearance. 2015; *J Thromb Haemost* 13 (5) S. 815–820.

Wu, T., Lin, J., Cruz, M.A., Dong, J.-f. und Zhu, C. Force-induced cleavage of single VWFA1A2A3 tridomains by ADAMTS-13. 2010; *Blood* 115 (2) S. 370–378.

Xu F., Droemann D., Rupp J., Shen H., Wu X., Goldmann T., Hippenstiel S., Zabel P., Dalhoff K. Modulation of the inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in a model of acute lung tissue infection. 2008; *Am J Respir Cell Mol Biol*. 39(5):522-9.

Yamaguchi, M., Terao, Y., Mori, Y., Hamada, S. und Kawabata, S. PfbA, a novel plasmin- and fibronectin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*, contributes to fibronectin-dependent adhesion and antiphagocytosis. 2008; *J Biol Chem* 283 (52) S. 36272–36279.

Yasuo Suda (Graduate School of Science Osaka University), URL: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/proteoglycan/PGB07E.html>

Zaccaria E., Cao R., Wells J. M., van Baarlen P. A Zebrafish Larval Model to Assess Virulence of Porcine *Streptococcus suis* Strains. 2016; *PLoS One*. 11(3): e0151623.

9 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1: Unbekapselte und bekapselte Pneumokokken	16
Abbildung 1-2: Häufigkeit der verschiedenen mikrobiellen Verursacher von Pneumonien ...	18
Abbildung 1-3: Relative Häufigkeit von auftretenden Penicillin- und Makrolidresistenzen bei <i>S. pneumoniae</i> in Europa.....	19
Abbildung 1-4: Serotypverteilung bei invasiven Pneumokokken-Erkrankungen.....	20
Abbildung 1-5: Impfstoff-vermittelte Verschiebung der vorherrschenden Pneumokokken-Serotypen.....	21
Abbildung 1-6: Polysaccharidkapsel adhärenter Pneumokokken und Struktur einer Pneumolysin-Pore	23
Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Ausbreitungswege der Pneumokokken im menschlichen Körper.....	29
Abbildung 1-8: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Serotyp 1 Pneumokokkus mit unterschiedlicher Kapselexpression	30
Abbildung 1-9: Schematische Darstellung des Querschnitts durch ein arterielles und ein venöses Blutgefäß	32
Abbildung 1-10: Molekülstruktur des Von Willebrand Faktor.....	33
Abbildung 1-11: Elektronenmikroskopische Darstellung von WPB	35
Abbildung 1-12: Der <i>Harvard-Apparatus</i> und Das ibidi®-Mikrofluidik-System.....	38
Abbildung 1-13: Vergleich der sequenzbasierten Domänen-Homologien zwischen Zebrafisch VWF und humanem VWF	40
Abbildung 3-1: Anschluss des Luer-Sildes an die Flusskultivierungseinheit	80
Abbildung 4-1: Bindung von iodiertem VWF an unterschiedlich bekapselte Pneumokokken-Stämme.....	88
Abbildung 4-2: SDS-Gele und Western Blots der Oberflächenproteine von <i>S. pneumoniae</i> ..	90
Abbildung 4-3: Ergebnis der Protein-Spot-VWF-Überlagerung unter nativen Bedingungen .	92
Abbildung 4-4: Quantifizierung der VWF-Bindungssignale der Spotmembran	93
Abbildung 4-5: Molekulargewichtskontrolle der verwendeten Eno-Proteinfraktionen.....	94
Abbildung 4-6: Konzentrationsabhängige Bindung von VWF durch die Pneumokokken Eno.	96
Abbildung 4-7: Kontrolle der initialen Fluoreszenz und MST-Kurven der Bindungsmessungen der Eno mit dem eGFP-VWF-Monomer.....	98
Abbildung 4-8: Bindungsdaten zur Eno-VWF-Interaktion sowie K_d -Wert und Hill-Koeffizient der MST-Bindungskurven.....	100

Abbildung 4-9: Ergebnis-Sensogram der SPR-Analyse zur VWF-Eno-Bindungskinetik.....	101
Abbildung 4-10: Ergebnis des Enolase-Peptidarrays	103
Abbildung 4-11: Position der sieben ermittelten putativen VWF-Bindungsmotive und des Plasminogen-Bindungsmotifes im Enolase-Homodimer und Homooktamer	104
Abbildung 4-12: Qualitätskontrolle der VWF-A Domänen nach SDS-Gelelektrophorese und Commassie-Blue-Färbung	106
Abbildung 4-13: Identifikation der mit der Pneumokokken-Eno interagierenden VWF-A-Domänen	107
Abbildung 4-14: Densitometrische Analyse der Interaktion der VWF-A-Domänen mit der Eno	108
Abbildung 4-15: Ergebnis-Sensogram der SPR-Analyse zur A-Domänen-Eno-Bindungskinetik	109
Abbildung 4-16: Bestimmung der THP-1 Phagozytoserate von Pneumokokken.....	111
Abbildung 4-17: Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen des THP-1 Phagozytoseassays.....	113
Abbildung 4-18: Effekt eine VWF-Präinkubation von Pneumokokken oder HUVECs auf die Adhärenz der Pneumokokken	116
Abbildung 4-19: Einfluss von VWF und ausgewählten Bindungsmodulatoren auf die Pneumokokken Vermehrung.....	118
Abbildung 4-20: Quantitative Bestimmung der Anzahl adhärenter Pneumokokken der Infektionsanalysen mit Endothelzellen	120
Abbildung 4-21: Fluoreszenzaufnahmen der Überlagerungsbilder von repräsentativen Bereichen der Infektionsanalysen mit Endothelzellen und Bindungsmodulatoren Bildtafel 1 von 2.....	121
Abbildung 4-22: Fluoreszenzaufnahmen der Überlagerungsbilder von repräsentativen Bereichen der Infektionsanalysen mit Endothelzellen und Bindungsmodulatoren Bildtafel 2 von 2.....	122
Abbildung 4-23: Quantitative Bestimmung der Anzahl adhärenter und invasiver Pneumokokken der Infektionsanalysen mit Endothelzellen	124
Abbildung 4-24: Fluoreszenzaufnahmen der Überlagerungsbilder von repräsentativen Bereichen der Infektionsanalysen mit Pneumokokken-Vorinkubation Teil 1.....	125
Abbildung 4-25: Fluoreszenzaufnahmen der Überlagerungsbilder von repräsentativen Bereichen der Infektionsanalysen mit Pneumokokken-Vorinkubation Teil 2.....	126

Abbildung 4-26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pneumokokken an faden-artigen Proteinen auf der Oberfläche von HUVECs	128
Abbildung 4-27: Elektronenmikroskopische Analyse des eingesetzten VWF von Merck	129
Abbildung 4-28: Verifikation der RFP-Transformation der Pneumokokken-Stämme PM01 und PM09	130
Abbildung 4-29: Kultivierung von HUVEC bei einem Scherstress von 10 dyn/cm ² über einen Zeitraum von 71 Stunden	132
Abbildung 4-30: Unterschiedliche VWF-Konformationen und Strukturen in Abhängigkeit der Flusskultivierungszeit der HUVECs	133
Abbildung 4-31: Darstellung ausgewählter Ereignisse bei dem Flusskulturinfektionsversuchen mit Histamin.....	135
Abbildung 4-33: Bindung von Pneumokokken an VWF-Fäden unter konstantem Scherstress von 10 dyn/cm ²	137
Abbildung 4-34: Rekrutierung von VWF an die Pneumokokken Oberfläche in der Flusskultivierung.....	138
Abbildung 4-35: Antikörperkontrolle für VWF-präinkubierte und nicht präinkubierte Pneumokokken (PM40).....	139
Abbildung 4-36: Verteilung der Pneumokokken nach der Injektion in das Herz der Zebrafischlarven.....	143
Abbildung 4-37: Kolokalisation der Pneumokokken (PM40) mit den endogenen VWF in Zebrafischlarven.....	145
Abbildung 4-38: Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie von Zebrafischlarven nach Injektion von VWF-präinkubierten Pneumokokken	147
Abbildung 4-39: Überlebensrate von Zebrafisch-Larven nach Infektion mit VWF-präinkubierten Pneumokokken.....	149
Abbildung 5-1: Darstellung der VWF-Bindemotive der Pneumokokken Eno (A) und des SpA von S. aureus (B+C).....	153
Abbildung 5-2: Interaktionsstellen und Domänenstruktur des VWF sowie die schematische Darstellung der Funktion bei Gefäßverletzungen	162
Abbildung 5-3: Schematische Darstellung der möglichen Pathomechanismen, die im Zusammenhang mit kardiovaskulären Komplikationen diskutiert werden.....	169
Abbildung 6-1: Zeitreihenaufnahme der Interaktion zwischen Pneumokokken und VWF-Fäden im Flusssystem.	171

Abbildung 6-2: Zeitreihenaufnahme der Interaktion zwischen Pneumokokken und dem Zebrafisch-Endothel	172
Abbildung 6-3: Enolase-Peptid-Membran	173
Abbildung 6-4: Abbildung 6-5: Abbildung 6 2: VWF-Überlagerungsmembran mit den sieben putativen VWF-Bindungs-Motifen	174
Abbildung 6-6: Signalspitzenform der Bindungsmessungen von Enolase und VWF-Monomeren	176
Abbildung 6-7: Einzelne Bindungskurven der drei Bindungsmessungen zur Eno-VWF-Interaktion	176
Abbildung 6-8: MST-Kontrollmessung zur Interaktion von GFP und Enolase.....	177
Abbildung 6-9: MST-Messung zur Multimerisierungsaktivität der Enolase	177
Abbildung 6-10: Messergebnisse zur Feststellung der Markierungseffizienz der Pneumokokken-Enolase	178
Abbildung 6-11: Fluoreszenzintensität des eGFP-Tag vom VWF-Monomer im Rot-Detektor	178
Abbildung 6-12: Rohdaten der Biacore-Sensogramme für die Eno-VWF- und Eno-A1-Domänen-Interaktionsmessung	181
Abbildung 6-14: Fluoreszenzvisualisierung der Flusskultivierung mit hitzeinaktiveiren PM40 Bakterien bei Histaminzugabe für 30 min (A) und 90 min (B)	182
Abbildung 6-15: Fluoreszenzvisualisierung der Flusskultivierung mit Pneumokokken (PM40) bei Histaminzugabe für 30 min (A) und 90 min (B)	183
Abbildung 6-16: Fluoreszenzvisualisierung der Flusskultivierung mit Pneumokokken (PM40) ohne Histaminzugabe für 90 min	184
Abbildung 4-32: Vergleich der Fadenanzahl und der an VWF-Fäden adhärrierender Bakterien mit und ohne Histamin in der Flusskultivierung	185
Abbildung 6-17: Fluoreszenzvisualisierung der Flusskultivierung mit Pneumokokken (PM40) bei Histaminzugabe und in gegenwart von Heparin für 30 min (A) und 90 min (B)	186
Abbildung 6-18: Fluoreszenzaufnahmen der Einzelkanäle von repräsentativen Bereichen der Infektionsanalysen mit Endothelzellen (Variante I).....	191
Abbildung 6-19: Fluoreszenzaufnahmen der Einzelkanäle der Infektionsanalyse mit Pneumokokken-Vorinkubation (Variante II)	195
Abbildung 6-20: Fluoreszenzaufnahmen und vergrößerte Bildausschnitte von adhärenen und invasiven Pneumokokken an und in humanen Endothelzellen.	196

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	42
Tabelle 3-2: Informationen zu verwendeten Bakterienstämmen	44
Tabelle 3-3: Information zu verwendeten Zelllinien und Zebrafisch-Stämme	46
Tabelle 3-4: Arbeitskonzentrationen und Herstellerangaben der verwendeten Antibiotika	47
Tabelle 3-5: Verwendete Enzyme und deren Hersteller	47
Tabelle 3-6: Verwendete Komponenten in den statischen Infektions-Assays	48
Tabelle 3-7: Arbeitskonzentrationen und Herstellern zu verwendeten Antikörpern	48
Tabelle 3-8: Zusammensetzung von Medien und Puffern	49
Tabelle 3-9: Zusammensetzung der verwendeten Färbelösungen	51
Tabelle 3-10: Verwendete Chemikalien und weitere Substanzen.....	52
Tabelle 3-11: Verwendete Fertigsysteme (Kits)	54
Tabelle 3-12: Zusammensetzung des verwendeten Polyacrylamidgels	59
Tabelle 3-13: Zusammensetzung des Q5 PCR-Ansatzes und angewendetes PCR-Programm	68
Tabelle 3-14: Konzentrationen der Bindungsmodulatoren in den Inhibitionsanalysen	76
Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Western Blots	90
Tabelle 6-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Spotmembran	175

Curriculum Vitae



Hilger Jagau
Am Kamp 1
38173 Dettum
05333/1647
hilger@jagau.de
August 1986.08.28 in Wolfenbüttel

Universitäre Ausbildung

- 04/2015 – im Abschluss **Doktorarbeit, Abteilung Zelluläre Infektionsbiologie**, TU Braunschweig;
Titel: Interaktion von *Streptococcus pneumoniae* mit Faktoren der Blutgerinnung
- 10/2011 - 02/2015 Master of Science (Ablussarbeitsnote Note: 1.0), **Abteilung Zelluläre Infektionsbiologie**, TU Braunschweig, Titel: Einfluss von *Paenibacillus larvae* auf das Darmmikrobiom der Honigbiene und Subtypisierung der pathogenen Genotypen ERIC I und II
- 10/2007 - 03/2011 Bachelor of Science (Ablussarbeitsnote: 1.0), **Abteilung Molekular- und Zell- Biologie**, TU Braunschweig, Titel: Expression und Aufreinigung humaner mARC Proteine in *Pichia pastoris*
- 10/2006 - 10/2007 Bioingenieurstudium (Diplom), TU Braunschweig

Konferenzbeiträge

- 09/2016 **3. German Pneumococcal and Streptococcal Symposium Braunschweig 2016, Vortrag:** *Streptococcus pneumoniae* triggers von Willebrand factor fiber formation
- 03/2017 **DGHM & VAAM Würzburg: Microbiology and Infection 2017 Microbiome, Poster:** *Streptococcus pneumoniae* binds Ultra Large Von Willebrand Factor
- 06/2017 **EuroPneumo 2017**
Vortrag: Von Willebrand factor as endothelial foothold for *Streptococcus pneumoniae* in the blood flow
- 11/2017 Maßgeblich mit beteiligt am **Günter Landbeck Excellence Award:** Hämophilie-Forschung in der Kategorie „Experimentelle Forschung“ von Frau PD Dr. Simone Bergmann
- 02/2018 **DGHM Jahrestagung Bochum**
Vortrag: Von Willebrand Factor Promotes Adhesion of *Streptococcus pneumoniae*
- 04/2018 **VAAM Jahrestagung Wolfsburg**

Poster: Human Von Willebrand factor, a new adhesion-co factor of *Streptococcus pneumoniae*

04/2018 **PROJEKT-SYMPOSIUM zur Interaktion von *Streptococcus Pneumonia* & von Willebrand Faktor; Vortrag:** VWF as new cofactor for adhesion of *S. pneumoniae*

06/2018 Ausgewählter Teilnehmer am **68th Lindau Nobel Laureate Meeting** (#LINO18)

Wehrdienst

Juli-Oktober 2006

Schulische Ausbildung

06/2006	Abitur Lessing Gymnasium Leopoldstraße in Braunschweig
08/2003 - 06/2006	Gymnasium Leopoldstraße in Braunschweig
02/2000 - 07/2003	Realschule Schöppenstedt
08/1999 - 02/2000	Gymnasium Gaußschule
08/1997 - 08/1999	Orientierungsstufe in Sickte
06/1993 - 07/1997	Grundschule in Dettum

Zuständigkeiten im Institut für Mikrobiologie

- DV-Koordinator Institut für Mikrobiologie und Labor Admin (Benutzerkonten pflegen und Einrichtung, hardware und software Beschaffung und Inbetriebnahme, IT-Sicherheit)
- Ersthelfer am Institute für Mikrobiologie
- Autoklav- und Sterilitäts-Beauftragter Institute für Mikrobiologie

Zusätzliche Fortbildungen

- Betreuung von 4 Masterstudentinnen und 1 Bachelorstudentin sowie Saalpraktika Grundkurs Einführung in die Mikrobiologie MI01 (praktische Betreuung und Praktikumsvorlesungen) und Medizinische Mikrobiologie IB29 (Unterstützung der Praktischen Betreuung 2017)
- Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für

biologische Sicherheit (§ 15 Abs. 4 GenTSV)

- Workshop im PEI zum Thema BSL3-„Fachkundige Person“ (TRBA 200)
- High Tech entrepreneurship (Gradschool: GradTUBS)
- GMP Kurs (Gradschool: GradTUBS)
- Personalführung (Gradschool: GradTUBS)
- Konflikt Management (Gradschool: GradTUBS)

Sprachen

English

Französisch

Gesellschaftliches Engagement

Seit 2016	Gründer der Faulbrutfeuerwehr und des Faulbrutfeuerwehr e.V. als neutral Kommunikations- und Arbeitsplattform für Imker, Veterinäre und Bienenwissenschaftler zur Verbesserung des Krisenmanagements und der Zusammenarbeit in der Seuchenprävention und Bekämpfung
Seit 2014	Obmann für das Gesundheitswesen im Kreisimkerverein Wolfenbüttel (~150 Mitglieder); Vorträge sowie theoretische und praktische Ausbildung von Jungimkern
Seit 2014	Zentraler Ansprechpartner für das Veterinäramt Wolfenbüttel bei Bienenseuchenbelangen und verantwortlich für Monitoringbeprobung und Unterstützung und Durchführung von Sanierungsmaßnahmen im Auftrag des Veterinäramtes
Seit 2008	Gründer der Sparte Bogenschießen mit Bogenschießtrainer Lizenz (MTV-Dettum)